

Versuche zur Gewinnung
Antikörper-sezernierender
Hybridoma-Kulturzellen
mittels Elektrofusion
im Vergleich zur PEG-Fusion

Heidemarie Gal

Disbui. München

1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554818_0082

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr
Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. H. Mahnel

Versuche zur Gewinnung Antikörper-sezernierender
Hybridoma-Kulturzellen mittels Elektrofusion im
Vergleich zur PEG-Fusion

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Heidemarie Gal
aus
Neunkirchen/Saar

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. H. Mahnel

Korreferent: Prof. Dr. U. Lösch

Tag der Promotion: 27. Februar 1987

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

1. Einleitung	1
2. Die Eltern	2
3. Die Kindheit	3
4. Die Jugend	4
5. Die Ausbildung	5
6. Die Berufswahl	6
7. Die ersten Schritte	7
8. Die ersten Erfahrungen	8
9. Die ersten Misserfolge	9
10. Die ersten Erfolge	10
11. Die ersten Entdeckungen	11
12. Die ersten Entwürfe	12
13. Die ersten Entwürfe	13
14. Die ersten Entwürfe	14
15. Die ersten Entwürfe	15
16. Die ersten Entwürfe	16
17. Die ersten Entwürfe	17
18. Die ersten Entwürfe	18
19. Die ersten Entwürfe	19
20. Die ersten Entwürfe	20
21. Die ersten Entwürfe	21
22. Die ersten Entwürfe	22
23. Die ersten Entwürfe	23
24. Die ersten Entwürfe	24
25. Die ersten Entwürfe	25
26. Die ersten Entwürfe	26
27. Die ersten Entwürfe	27
28. Die ersten Entwürfe	28
29. Die ersten Entwürfe	29
30. Die ersten Entwürfe	30
31. Die ersten Entwürfe	31
32. Die ersten Entwürfe	32
33. Die ersten Entwürfe	33
34. Die ersten Entwürfe	34
35. Die ersten Entwürfe	35
36. Die ersten Entwürfe	36
37. Die ersten Entwürfe	37
38. Die ersten Entwürfe	38
39. Die ersten Entwürfe	39
40. Die ersten Entwürfe	40
41. Die ersten Entwürfe	41
42. Die ersten Entwürfe	42
43. Die ersten Entwürfe	43
44. Die ersten Entwürfe	44
45. Die ersten Entwürfe	45
46. Die ersten Entwürfe	46
47. Die ersten Entwürfe	47
48. Die ersten Entwürfe	48
49. Die ersten Entwürfe	49
50. Die ersten Entwürfe	50
51. Die ersten Entwürfe	51
52. Die ersten Entwürfe	52
53. Die ersten Entwürfe	53
54. Die ersten Entwürfe	54
55. Die ersten Entwürfe	55
56. Die ersten Entwürfe	56
57. Die ersten Entwürfe	57
58. Die ersten Entwürfe	58
59. Die ersten Entwürfe	59
60. Die ersten Entwürfe	60
61. Die ersten Entwürfe	61
62. Die ersten Entwürfe	62
63. Die ersten Entwürfe	63
64. Die ersten Entwürfe	64
65. Die ersten Entwürfe	65
66. Die ersten Entwürfe	66
67. Die ersten Entwürfe	67
68. Die ersten Entwürfe	68
69. Die ersten Entwürfe	69
70. Die ersten Entwürfe	70
71. Die ersten Entwürfe	71
72. Die ersten Entwürfe	72
73. Die ersten Entwürfe	73
74. Die ersten Entwürfe	74
75. Die ersten Entwürfe	75
76. Die ersten Entwürfe	76
77. Die ersten Entwürfe	77
78. Die ersten Entwürfe	78
79. Die ersten Entwürfe	79
80. Die ersten Entwürfe	80
81. Die ersten Entwürfe	81
82. Die ersten Entwürfe	82
83. Die ersten Entwürfe	83
84. Die ersten Entwürfe	84
85. Die ersten Entwürfe	85
86. Die ersten Entwürfe	86
87. Die ersten Entwürfe	87
88. Die ersten Entwürfe	88
89. Die ersten Entwürfe	89
90. Die ersten Entwürfe	90
91. Die ersten Entwürfe	91
92. Die ersten Entwürfe	92
93. Die ersten Entwürfe	93
94. Die ersten Entwürfe	94
95. Die ersten Entwürfe	95
96. Die ersten Entwürfe	96
97. Die ersten Entwürfe	97
98. Die ersten Entwürfe	98
99. Die ersten Entwürfe	99
100. Die ersten Entwürfe	100

1.	Einleitung	1
2.	Schrifttum	3
2.1.	Fusion von Zellen	3
2.2.	Fusion von Zellen mittels Polyäthylenglykol	4
2.3.	Elektrofusion von Zellen	8
2.3.1.	Entwicklung der Elektrofusion	8
2.3.2.	Prinzip der Elektrofusion	9
2.3.3.	Geräte und die Fusion beeinflussende Faktoren	19
2.3.4.	Vorteile der Elektrofusion, Anwendungsbereich und Bedeutung für die Zukunft	28
3.	Eigene Untersuchungen	31
3.1.	Material und Methoden	31
3.1.1.	Kultivierung von Myelomzelllinien	31
3.1.2.	Antigenherstellung	31
3.1.2.1.	Virusantigen	31
3.1.2.2.	Virusvermehrung	32
3.1.2.3.	Virusreinigung	32
3.1.2.4.	Virustitration	34
3.1.3.	Immunisierung der Mäuse	34
3.1.4.	Zellfusion mittels Polyäthylenglykol und Elektrofusion	35
3.1.4.1.	Aufbereitung der Milz	35
3.1.4.2.	Vorbereitung der Myelomzellen	36
3.1.4.3.	Fusion mittels Polyäthylenglykol	37
3.1.4.4.	Elektrofusion	37

3.1.5.	Nachweis von Antikörpern in Hybridoma-	
	kulturüberständen	38
3.1.5.1.	Enzyme-linked immunosorbent assay	38
3.1.5.2.	Neutralisationstest und Hämagglutina-	
	tionshemmungstest	38
3.1.6.	Isolierung von antikörperproduzierenden	
	Hybridomas und deren Klonierung	39
3.2.	Versuche und Ergebnisse	40
3.2.1.	Immunisierung der Mäuse	40
3.2.2.	Fusion mittels Polyäthylenglykol	40
3.2.2.1.	Verwendete Zellzahl	40
3.2.2.2.	Fusion mittels Polyäthylenglykol und	
	Ergebnisse	40
3.2.3.	Elektrofusion	42
3.2.3.1.	Verwendete Zellzahl	42
3.2.3.2.	Einstellung des Gerätes	42
3.2.3.3.	Verwendete Kammer	43
3.2.3.4.	Allgemeine Kriterien	43
3.2.3.5.	Ergebnisse der Elektrofusion	45
4.	Diskussion	59
5.	Zusammenfassung	64
	Summary	66
6.	Literaturverzeichnis	68

1. Einleitung

Im Jahre 1975 gelang es Köhler und Milstein erstmalig antikörperproduzierende Zellen in vitro zu kultivieren. Diese sogenannten Hybridome erhielten sie, indem sie Milzzellen immunisierter Mäuse mit Mäusemyelomzellen (permanente Zelllinie) fusionierten. Als Fusionsvermittler diente ihnen inaktiviertes Sendaivirus.

In der folgenden Zeit wurde versucht Fusionsvermittler zu finden, die einfacher herzustellen und zu behandeln sind. Polyäthylenglykol hat in der Folge als chemische Substanz bis heute die größte Bedeutung errungen

Im Jahre 1982 wurde von Vienen und Zimmermann zum erstenmal die Gewinnung von Mäusehybridomzellen mit Hilfe der Elektrofusion beschrieben. Diese neue Fusionstechnik soll eine Verbesserung gegenüber den alten Techniken (Viren, Chemikalien) darstellen. Als Vorteile der Elektrofusion allgemein werden die höhere Ausbeute an Hybridomen, das breitere Spektrum der Anwendung, die visuelle Kontrolle unter dem Mikroskop und die gezielte Fusion einzelner Zellen genannt. Außerdem brauchen bei der Elektrofusion keine toxischen Substanzen zugesetzt werden.

Als Fernziel der Elektrofusion gilt die gezielte Fusion einzelner antikörperproduzierender B-Lymphozyten mit Myelomzellen, um so direkt Klone antikörperproduzierender Hybridomzellen zu

gewinnen, ohne den Weg über die Klonierung der Zellen gehen zu müssen.

Aufgabe der Arbeit war es die neue Technik der Elektrofusion von Zellen mit der im Labor gut eingeführten Fusion über Polyäthylenglykol unter dem Aspekt der Gewinnung antikörperproduzierender in vitro kultivierbarer Hybridomzellen zu vergleichen.

2. Schrifttum

2.1. Fusion von Zellen

Unter einer Fusion von Zellen versteht man das Vereinigen zweier oder mehrerer Zellen, die jedoch zuvor in engen Membrankontakt treten müssen. Dabei kommt es zunächst zur Verschmelzung der Zellmembranen und des Zytoplasmas (Plasmogamie). Es entsteht dann eine Zelle mit zwei oder mehreren Kernen (Heterokaryont). Anschließend können auch die Kerne verschmelzen (Karyogamie), wodurch ein sogenannter Synkaryont gebildet wird. Dies ist eine Voraussetzung zur Entstehung antikörperproduzierender Hybridomzellen. Ob ein Verschmelzen der Kerne (oder ein Chromosomenaustausch) eintritt, hängt von verschiedenen Faktoren ab, denn die Kerne müssen in engen Kontakt gelangen. Eine große Rolle spielt die Größe der Kerne, d.h. ihr Volumenanteil am Gesamtzellvolumen. Bei Zellen mit relativ großen Kernen, wie tierische Zellen, z.B. Myelomzellen und Lymphozyten (Kernvolumen 50-70% des Gesamtzellvolumens), tritt deshalb eine Kernfusion eher ein als bei Zellen mit kleinen Kernen, wie z.B. Hefezellen (Kernvolumen 30% des Gesamtzellvolumens). Andererseits nimmt aber mit der Größe der Kerne ihre Beweglichkeit ab, so daß Abstände von 10-100µm relativ schwer zu überwinden sind. Auch das Zellskelett und die Viskosität des Plasmas hemmen die Beweglichkeit. Aufgrund dieser Bedingungen wird verständlich, warum der Ausbeute an antikörperprodu-



zierenden Hybridomzellen durch die Fusion von Zellen Grenzen gesetzt sind (Zimmermann et al., 1985).

Die Fusion von Zellen kann durch verschiedene künstliche Hilfsmittel, die mehr oder weniger effektiv sind, gefördert werden. Köhler und Milstein (1975) verwendeten für die Gewinnung antikörperproduzierender Hybridomzellen als Fusionsvermittler inaktiviertes Sendai-virus. Lysolecithin wurde von Croce et al. (1971) und von Ahkong et al. (1972) als Fusagen beschrieben. Ahkong et al. (1973) haben auch Fettsäuren, Ester, Retinol und α -Tocopherol als Fusionsvermittler untersucht. Cramp und Lucy (1974) berichteten über Zellfusionen mit Glycerolmonooleat. Selbst mit Ca^{2+} als Fusionsvermittler wurde experimentiert (Toister und Loyter 1971). Gefrieren und Tauen beschrieb Lucy (1970) als Möglichkeit, Zellen zu fusionieren. Nähere Einzelheiten über die Fusionsvermittler hat Tappert (1981) beschrieben.

2.2. Fusion von Zellen mittels Polyäthylenglykol

Polyäthylenglykol (PEG) wurde von Pontecorvo (1975) erstmals zur Fusion von Säugerzellen verwendet. Zur Zeit werden die meisten Zellfusionen mit dieser Substanz als Fusionsvermittler durchgeführt (Westerwoudt, 1985).

Die Zellen müssen vor der Fusion engen Membrankontakt aufweisen. Dies wird normalerweise durch die negative Oberflächenladung der Zellen und durch

abstoßende Hydrationskräfte verhindert. Befinden sich die Zellen in Suspension, dann spielen auch noch Brown'sche Bewegungen eine Rolle (Zimmermann et al., 1984). Polyäthylenglykol verringert deutlich das Oberflächenpotential biologischer Membranen und verursacht eine Ladungsneutralisation der Zellmembranen. Es ist in wässrigen Lösungen leicht negativ geladen, hydrophil und bindet in Lösungen Wasser. Die damit verbundene Dehydratation scheint bei der Fusion, vermittelt durch PEG, eine Rolle zu spielen (Westerwoudt, 1985).

Was an den Zellmembranen bei der Fusion genau stattfindet wird bisher nur vermutet. Die Zellmembran von Säugerzellen besteht aus einer doppelten Schicht von Phospholipiden und darin eingebetteten Proteinen. Die Phospholipide besitzen einen hydrophilen und einen hydrophoben Teil. Die hydrophoben Teile sind in der Membran einander zugewandt, wie auch die hydrophoben Bereiche der Proteine in das Innere der Membran eingebettet vorliegen (Flüssig-Mosaik-Modell). Da die Membranbestandteile ausschließlich durch nicht-kovalente Bindungen zusammengehalten werden, können die Lipide und im allgemeinen auch die Proteine innerhalb der Membranebene lateral diffundieren (Jungermann und Möhler 1980).

Man nimmt nun an, daß es zunächst zu einer Störung der zweischichtigen Struktur der Membranlipide kommt, was zur Folge hat, daß die Fluidität der Membran erhöht wird. Diese Änderung in der Lipidstruktur der Membran erlaubt die Aggregation intra-

membranöser Proteinpartikel, wodurch gleichzeitig von Proteinen befreite Zonen in der Membran entstehen. In diesen proteinfreien Bereichen der Membranen einander anhaftender Zellen kann es nun zur Interaktion und zum Vermischen der Lipide beider Zellmembranen kommen, wonach die Fusion der beiden Zellen möglich wird (Ahkong et al., 1975). (Abb. 1)

Im Handel ist Polyäthylenglykol mit unterschiedlichem Molekulargewicht erhältlich. Experimentell wurde ermittelt, daß sich mit PEG mit dem Molekulargewicht von 1000 bei Einschichtzellkulturen die höchste Ausbeute an Fusionen erzielen läßt (Davidson et al., 1976). PEG mit dem Molekulargewicht von 4000 hat sich dagegen für Zellen in Suspension als am günstigsten erwiesen (Fazekas de St. Groth und Scheidegger, 1980) und zwar in einer Konzentration von 50%. Den Einfluß der verschiedenen Konzentrationen von PEG haben Gefter et al. (1977) untersucht.

Der optimale pH-Wert der PEG-Lösung liegt nach Westerwoudt (1985) bei 8,0-8,2.

Eine Einwirkungsdauer von PEG auf die Zellen von einer Minute scheint optimal zu sein. Danach muß das PEG stark verdünnt werden (Davidson und Gerald, 1976).

Der Zusatz von 15% Dimethylsulfoxid (DMSO) zur PEG-Lösung soll nach Norwood et al. (1976) die Hybrid- ausbeute bei den Zellfusionen fördern. DMSO soll wie PEG das Oberflächenpotential biologischer Membranen herabsetzen und Ladungsneutralisation der Zellmembran verursachen (Westerwoudt, 1985).

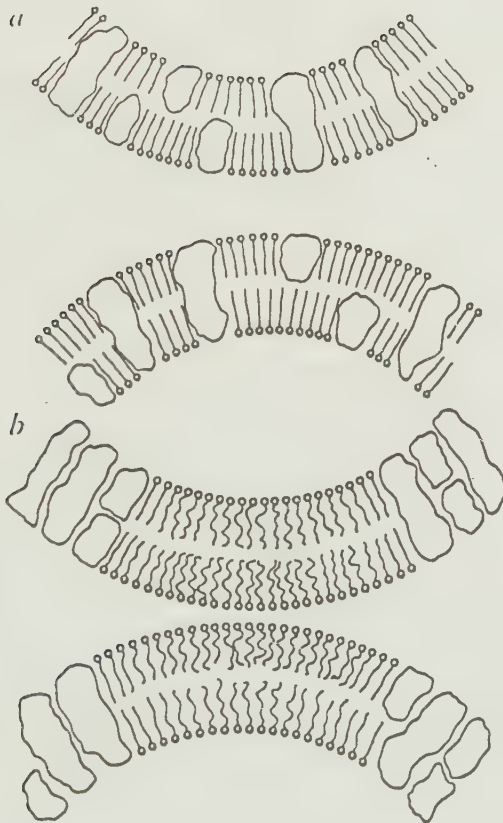


Abb. 1

Mögliche Beziehung zwischen den Lipidmolekülen und den Proteinen biologischer Membranen während des Fusionsschrittes.

(Abb. nach Ahkong et al., 1975).

2.3. Elektrofusion von Zellen

2.3.1. Entwicklung der Elektrofusion

Im Jahre 1973 haben Zimmermann et al. herausgefunden, daß hohe elektrische Feldimpulse von sehr kurzer Dauer zu einer experimentell kontrollierbaren Erhöhung der Permeabilität von Zellmembranen führen. Dieser Effekt wurde "reversibler elektrischer Durchbruch" genannt, um hervorzuheben, daß die Zellmembran trotz dieser feldinduzierten Störung zur Regeneration fähig ist (Zimmermann, 1983, Zimmermann et al., 1974).

Dieser reversible elektrische Durchbruch der Zellmembranen wurde dann 1978 von Zimmermann und Pilwat ausgenützt, um Zellen zu fusionieren.

Im Jahre 1980 schließlich wurden die Zellen durch das Anlegen eines inhomogenen Wechselstromfeldes von schwacher Intensität in engen Membrankontakt verbracht, welcher zur Fusion der Zellen notwendig ist. Dadurch war man von allen chemischen Substanzen, die man vorher zur Fusion brauchte, unabhängig geworden. Es wurden damals nur Pflanzenzellen, Erythrozyten und Vakuolen zur Fusion verwendet

(Zimmermann et al., 1980a). Im gleichen Jahr wurde der reversible elektrische Durchbruch der Zellmembranen ausgenützt, um Thymozyten und Erythrozyten von Mäusen mit Arzneimitteln und Farbstoffen zu beladen (Zimmermann et al., 1980b).

1981 gaben Zimmermann et al. eine ausführliche Beschreibung der Membranvorgänge während des elektrischen

schen Durchbruchs. Richter, Scheurich und Zimmermann haben 1981 zum erstenmal Seeigeleier fusioniert.

Mausehybridomzellen aus Mäuselymphozyten und Mäusemyelomzellen zu gewinnen gelang schließlich Vienken und Zimmermann ein Jahr später. Sie verwendeten dazu die spezielle Technik der sogenannten Elektrohdraulik.

2.3.2. Prinzip der Elektrofusion

Im Prinzip besteht die Elektrofusion von Zellen aus zwei Schritten. Beim ersten Schritt wird der enge Zellmembrankontakt durch elektrische, elektromechanische oder magnetische Kräfte (Vienken und Zimmermann, 1985) oder durch Schallwellen oder Laserstrahlen (Arnold und Zimmermann, 1986) hergestellt. Danach wird die Fusion der Zellen ausgelöst, indem diese einem hohen elektrischen Feldimpuls von sehr kurzer Dauer unterworfen werden. Dieser Feldimpuls ist verbunden mit einer enormen Erhöhung der Permeabilität der Zellmembranen in der Kontaktzone und führt zum sogenannten reversiblen elektrischen Durchbruch, als reversible electrical breakdown bezeichnet (Zimmermann et al., 1985). Danach kommt es zum Verschmelzen der Zellmembranen zweier oder mehrerer Zellen.

Die zu fusionierenden Zellen müssen zunächst engen Membrankontakt aufweisen. Abstoßende Kräfte wie die Brown'sche Bewegung, die negative Zelloberflächenladung oder die Hydrationskräfte (Zimmermann et

al., 1984) verhindern jedoch eine Annäherung der Zellen auf weniger als 20 nm (Zimmermann und Vienken, 1984). Im Rahmen der Elektrofusion lassen sich durch das Anlegen eines inhomogenen elektrischen Feldes diese abstoßenden Kräfte am günstigsten überwinden. Verbringt man die Zellen in ein solches inhomogenes elektrisches Feld, so entstehen aus den Zellen sogenannte Dipole, welche in Richtung der höchsten Feldstärke wandern. In einem homogenen elektrischen Feld wandern die entstandenen Dipole nicht (Zimmermann und Vienken, 1982), da es in dem Feld keine Stelle gibt wo eine höhere Feldstärke herrscht. Die Dipole entstehen durch die Ladungstrennung innerhalb der Zellmembran (vgl. unten). Die Richtung der Zellwanderung ist unabhängig von der Richtung des applizierten Feldes, so daß man auch ein Feld mit Wechselstrom anlegen kann. Aus diesem Grund wird der Prozeß Dielektrophorese genannt, im Gegensatz zur Elektrophorese, die nur in einem mit Gleichstrom angelegten Feld stattfinden kann, vorausgesetzt, daß die Partikel eine Nettoladung besitzen.

Durch das Wandern der Zellen im inhomogenen elektrischen Feld kommt es zur Ausbildung sogenannter Perlenketten (pearl chains), die sich entlang der externen Feldlinien ausrichten. In dieser Formation besteht enger Membrankontakt zwischen den Zellen, so daß der Fusionsimpuls ausgelöst werden kann (Abb. 2). Dieses angelegte inhomogene elektrische Feld wird auch Zellausrichtungsfeld (cell alignment field) genannt (Zimmermann und Vienken, 1984).

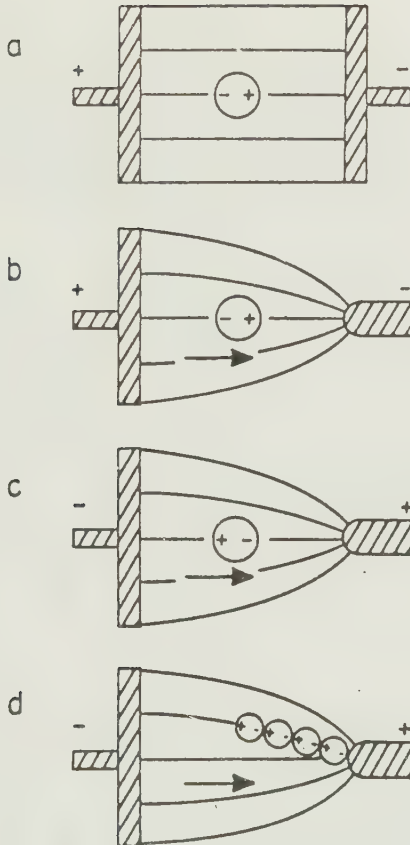


Abb. 2

Schematische Darstellung des Verhaltens einer Zelle im homogenen (a) und inhomogenen (b,c) elektrischen Feld. Die Richtung der Dielektrophorese ist unabhängig von der Polarität des Feldes (b,c). Mehrere Zellen bilden die Formation einer Perlenkette im inhomogenen elektrischen Feld (d).

(Abb. nach Zimmermann und Vienken, 1984).

Zimmermann et al. haben 1985 die folgenden physikalischen und biologischen Zusammenhänge mit der Elektrofusion beschrieben. Die Zellmembran kann als eine dielektrische Schicht aufgefaßt werden, wobei die wässrigen Lösungen auf jeder Seite als Kondensatorplatten dienen. In einem elektrischen Kreisdiagramm ist die Membran deshalb darstellbar als Kondensator mit parallel geschaltetem Widerstand (Abb. 3). Legt man nun ein äußeres elektrisches Feld an, so kommt es am Membrankondensator zur Ladungstrennung infolge der Ionenverschiebung. Dies führt zu einem transmembranären Potential, welches die folgende Beziehung zu dem angelegten äußeren elektrischen Feld im Falle von sphärischen Zellen besitzt

$$V = 1,5 \times E \times a \times \cos \delta$$

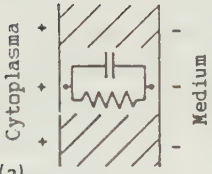
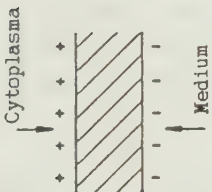
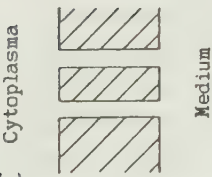
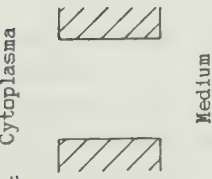
wobei V das induzierte Membranpotential darstellt, E die Feldstärke, a den Zellradius und δ den Winkel zwischen einer gegebenen Membranseite und der Feldrichtung.

Aus der Gleichung geht hervor, daß das Membranpotential direkt proportional zur angelegten Feldstärke, zum Zellradius und zum Cosinus des Winkels δ ist. Bei einer gegebenen Feldstärke ist demnach das induzierte Membranpotential bei kleinen Zellen geringer als bei großen. Durch die Abhängigkeit vom Winkel δ erreicht bei gegebener Feldstärke und gegebenem Zellradius das induzierte Membranpotential an verschiedenen Stellen der Membran verschiedene Werte. In Feldrichtung, an den sogenannten Polen

Abb. 3

Einfluß eines äußeren angelegten elektrischen Feldes E auf eine Zellmembran.

(Abb. nach Zimmermann, 1983).

- (a)  a Zellmembran mit einem Potential V_m (innen: elektrisches Kreisdiagramm).
- (b)  b Ein äußeres elektrisches Feld E erhöht das Membranpotential ($V > V_m$) und die Ladung der Membran, welche eine Kompression der Membran verursacht.
- (c)  c Weitere Erhöhung von E führt zu einem kritischen Membranpotential und zur Porenbildung (reversibler Durchbruch).
- (d)  d Wenn E zu hoch angelegt wird kommt es zur Bildung sehr grosser Poren (irreversibler Durchbruch).

der Zelle, ist das induzierte Membranpotential am größten, da hier der Winkel δ gleich null ist und der Cosinus von δ eins beträgt. Am sogenannten Äquator der Zelle aber, wo δ gleich 90° ist und somit $\cos \delta$ null beträgt, ist das induzierte Membranpotential gleich null (Abb. 4).

Aus diesen Zusammenhängen läßt sich schließen, daß bei steigend angelegten elektrischen Impulsen, die zum elektrischen Durchbruch der Zellmembranen führen, zuerst die größeren Zellen betroffen sind und dann die kleineren, und daß bei der Einzelzelle der Durchbruch zuerst nur an den Polen stattfindet und sich erst bei Steigerung der Impulse in Richtung Äquator ausdehnt. Dies ist von Bedeutung bei der Fusion kleinerer mit größeren Zellen und bei der Anordnung der Elektroden, welche bei der Fusion exakt parallel verlaufen müssen.

Durch das Anlegen eines äußeren elektrischen Feldes kommt es zur Ladungstrennung. Das bedeutet, daß innere und äußere Membranseiten jeweils stärker positiv bzw. negativ geladen sind, was eine stärkere gegenseitige Anziehung der Membranseiten bewirkt und die Membran selbst dünner wird. Diesen elektrischen Kompressionskräften stehen die elastischen Wiederherstellungskräfte der Membran gegenüber. Mit der Erhöhung des elektrischen Feldes und somit auch des Membranpotentials wird schließlich eine kritische Membrandicke erreicht. Die Membran wird instabil und es entstehen Poren (elektrischer Durchbruch), die sich mit intra- oder extrazellulären Flüssigkeiten füllen, welche normalerweise

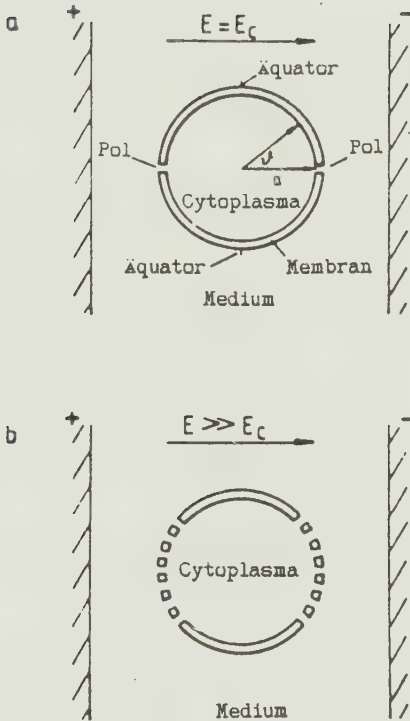


Abb. 4

Schematische Darstellung einer Zelle, die einer hohen elektrischen Feldstärke ausgesetzt wird.
(Abb. nach Zimmermann et al., 1985).

beide eine hohe Leitfähigkeit besitzen. Die dadurch entstehende elektrische Permeabilitätserhöhung der Membran führt zu einer sehr raschen Entladung des Membrankondensators. Während dieses Vorganges erhält die Membran ihre ursprüngliche Dicke zurück (Abb. 3). Die entstandenen Poren können sich bei höheren Temperaturen (ca. 37° C) durch Diffusion von Lipidmolekülen wieder schließen, vorausgesetzt, daß die betroffene Zone der Membranoberfläche im Verhältnis zur Gesamtoberfläche nicht zu groß ist. Auf der anderen Seite kann, wenn durch höhere kritische Feldstärken mehr und mehr Poren entstehen oder die Einzelporen zu groß werden, der Anteil der Poren an der Gesamtoberfläche der Membran so ungünstig werden, daß die Membran nicht mehr in der Lage ist, die Poren zu schließen. Der reversible elektrische Durchbruch (breakdown) geht in einen irreversiblen mechanischen Durchbruch über, welcher unweigerlich mit der Zerstörung der Zelle verbunden ist.

Diese Beschreibungen beziehen sich auf die Einzelzelle im elektrischen Feld. Bei der Elektrofusion von Zellen muß man aber dicht aneinandergelagerte Zellen betrachten. Um die Vorgänge an den Membranen zu veranschaulichen, bedient man sich auch hier am besten des Flüssig-Mosaik-Modells nach Singer 1975. Eine Reihe von Hinweisen sprechen dafür, daß auch bei der Elektrofusion, wie bei der chemischen und viralen Fusion (Zimmermann, 1982), in der Kontaktzone der Zellmembranen keine intramembranösen Partikel (Proteine) vorhanden sein dürfen. Wahrscheinlich führt das Anlegen eines schwachen elek-

trischen Feldes zum Wandern der Membranproteine, so daß proteinfreie Zonen entstehen, welche aber auch durch Vorbehandlung der Zellen mit proteolytischen Enzymen wie Pronase, Dispase oder Neuraminidase entstehen können. In diesen Zonen findet beim Verabreichen des Durchbruchimpulses die Porenbildung in den Membranen statt. Die Poren füllen sich sofort mit zytoplasmatischer Flüssigkeit beider Zellen, so daß es nicht zur Wiederherstellung der jeweiligen Zellmembran kommt, sondern zur Brückenbildung zwischen den Zellen. Diese Brückenbildung kommt durch die Diffusion der Lipidmoleküle zustande und führt zur Membrankontinuität zwischen den Zellen, zusätzlich zur bereits entstandenen Plasmakontinuität. In den Verbindungszonen der Zellmembranen weisen diese nun sehr kleine Krümmungsradien auf, so daß diese Konfiguration instabil ist und aus thermodynamischen Gründen versucht sphärische Gestalt anzunehmen, ohne daß weitere Energie zugeführt werden müsste (Kuta et al., 1985). Die Fusion der beiden Zellmembranen ist damit beendet (Abb. 5). Wenn zwei gleich große Zellen fusionieren, vermindert sich ihre Gesamtmembranoberfläche um 20%, was bedeutet, daß Membranteile überflüssig geworden sind (Zimmermann et al. 1985, Zimmermann et al., 1984). Diese Membranteile bilden sogenannte "inside-out" Vesikel (die ursprünglichen Membraninnenseiten befinden sich nun auf der Außenseite der Vesikel) (Zimmermann et al., 1985).

In neuerer Literatur wird die Bildung von Poren beim elektrischen Durchbruch der Membran an-

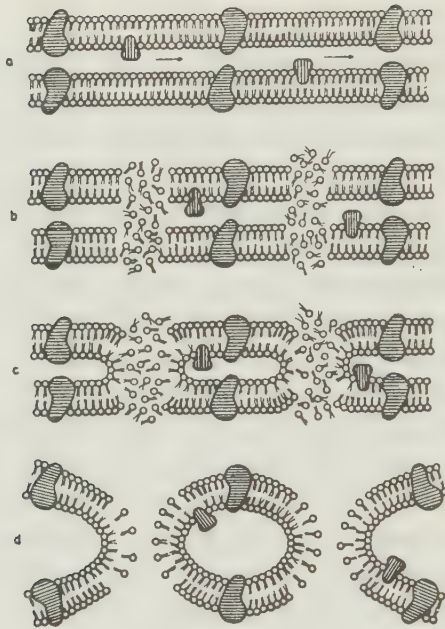


Abb. 5

Modell für die möglicherweise während der Fusion ablaufenden molekularen Vorgänge:

a Zwei Zellmembranen in engem Kontakt. Durch Wanderung der Proteine entstehen proteinfreie Zonen.

b Der elektrische Durchbruch führt zu lokalen Störungen der Membranstruktur.

c Brückenbildung zwischen den Zellmembranen durch Diffusion der Lipide.

d Wiederherstellung der verschmolzenen Zellmembranen und Bildung von "inside-out" Vesikeln.

(Abb. nach Zimmermann und Vienken, 1984 und Zimmermann et al., 1985).

gezweifelt mit der Begründung, daß kleinere Zellen durch die Membran größerer Zellen hindurch geschleußt werden können, ohne daß die Wirtszelle irreversibel geschädigt wird. Wenn man nun am Porenmodell festhält, so müssten Poren mit einem Durchmesser von $2\mu\text{m}$ und mehr entstehen. Durch die dadurch entstehende Membranspannung sollte aber die Zellmembran der Wirtszelle mechanisch reißen. Zimmermann und Stopper (1986) lehnen deshalb den von Neumann et al. (1982) gebrauchten Begriff "Elektroporation" ab zu Gunsten der Bezeichnung "Elektropermeabilisierung" und "reversibler elektrischer Durchbruch", welche beide die ablaufenden molekularen Mechanismen an den Zellmembranen offen lassen.

2.3.3. Geräte und die Fusion beeinflussende Faktoren

Zur Durchführung einer Elektrofusion von Zellen benötigt man eine Apparatur, mit deren Hilfe das benötigte Zellausrichtungsfeld (cell alignment field) angelegt und die benötigten elektrischen Impulse für die eigentliche Fusion erzeugt werden können. Sie muß über einen Spannungsgenerator, einen Kondensator, einen Schalter, einen Frequenzgenerator und über zwei Platinelektroden (Fusionskammer) verfügen (in der Abbildung 6 gezeigte Anordnung). Ein derartiges System stellt das Zimmermann Cell Fusion™ System von der Firma GCA Corporation Chicago, Illinois, USA dar.

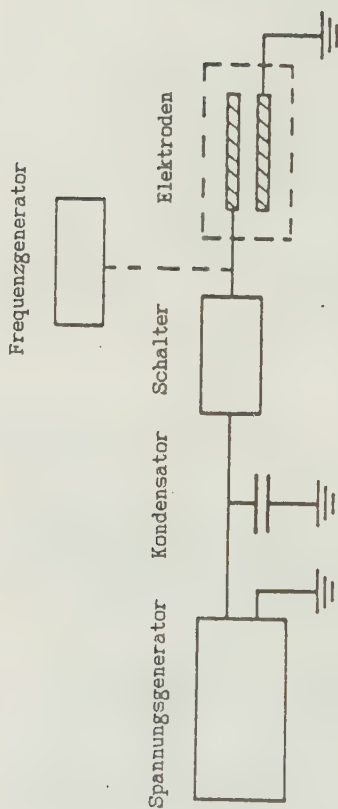


Abb. 6

Apparatur, die zum Auslösen des elektrischen Durchbruchs benötigt wird. (Abb. nach Zimmermann, 1983).

Bei diesem Gerät sind folgende Parameter einstellbar:

Cell Alignment (ac) Frequency, 10kHz bis 5MHz
Zellausrichtungsfrequenz, Wechselstrom.

Cell Alignment (ac) Voltage, 0 bis 35 Volt
Zellausrichtungsspannung, Wechselstrom.

Cell Alignment Duty cycle, 1% bis 100%
Funktionsperiode der Zellausrichtung; gibt die Zeit in Prozent an, in der das Ausrichtungsfeld eingeschaltet ist. Man kann damit die zu verabreichende elektrische Energie möglichst gering halten (Zimmermann et al., 1985).

Cell Alignment Voltage Limit, 1 bis 35 Volt
Grenze der Zellausrichtungsspannung mit akustischer Warnung.

Cell Fusion (dc) Voltage Range, 0 bis 250 Volt
Bereich der Zellfusionsspannung, Gleichstrom.

Cell Fusion Pulse Duration, 0 bis 99,9 Mikrosekunden, Dauer des Zellfusionsimpulses.

Number of Fusion Pulses, 1 bis 9
Anzahl der Fusionsimpulse.

Time between Fusion Pulses, 0,1 bis 9,9 Sekunden
Zeit zwischen den Fusionsimpulsen

Between Pulse Alignment Off Time, Millisekunden
Zeit zwischen den Impulsen, in der das Ausrichtungs-
feld abgeschaltet ist.

Post-Fusion Alignment Control, pre-set and con-
tinuous; Einstellung ob das Ausrichtungsfeld
nach der Fusion langsam abklingen soll oder mit
gleicher Intensität weiter fortbestehen soll
bis das Gerät ausgeschaltet wird.

Process Timer, Sekunden

gibt die Zeit in Sekunden an, die vom Anlegen
des Ausrichtungsfeldes an über den Fusions-
schritt hinaus bis zum Abklingen des Ausrichtungs-
feldes verstrichen ist.

Der Ablauf der Zellausrichtung und der Fusion auf
elektrischer Ebene ist einfach darstellbar (Abb.
7).

Die Elektroden müssen für die Fusion exakt parallel
verlaufen. Ihr Abstand beträgt dabei in der Regel
zwischen 100 und 500 μm je nach Zellgröße, Anzahl
der Zellen, die fusioniert werden sollen, und
Spannungsleistung des benützten Gerätes (Zimmermann
et al., 1985). Es wurden bereits verschiedenste
Fusionskammern entwickelt (näheres siehe Zimmermann
et al., 1985, Zimmermann et al., 1984a, Vienken et
al., 1983, Vienken und Zimmermann, 1982, Zimmermann
und Vienken, 1982), wobei die Elektroden aus Pla-
tin, Gold oder Nickel/Chrom bestehen (Zimmermann et

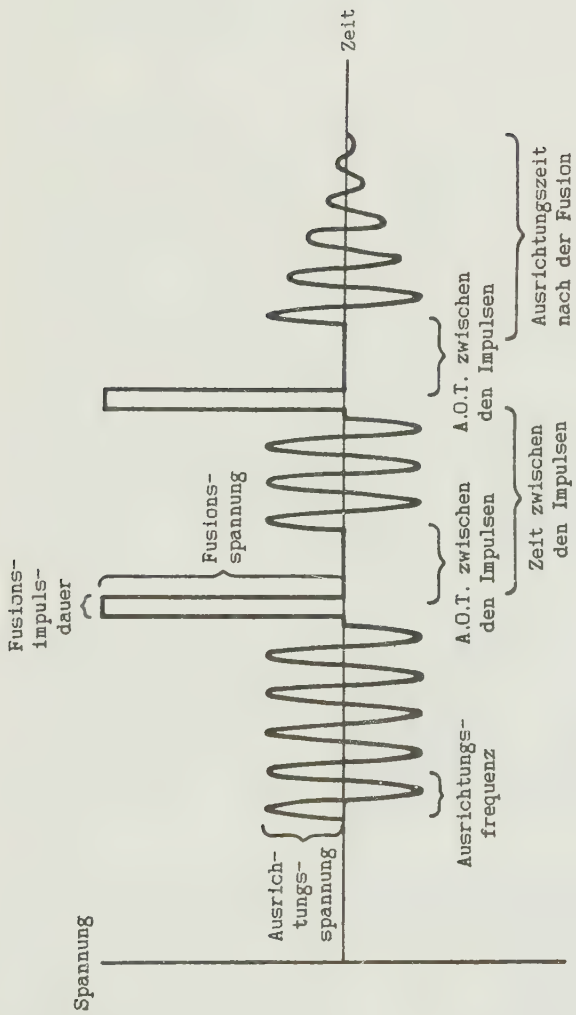


Abb. 7

Ablauf der Zellausrichtung und der Fusion auf elektrischer Ebene. (Abb. nach GCA/Precision Scientific Group, 1983).

al., 1985). Hier seien nur die beiden Kammern beschrieben, die bei den eigenen Untersuchungen benutzt worden sind, nämlich die offene flache Kammer und die geschlossene Helikalkammer. Die offene flache Kammer stellt die einfachste Kammer dar und besteht aus den beiden Elektroden, die parallel auf einem Objektträger befestigt sind. Diese Kammer ist dazu geeignet die Fusion unter dem Mikroskop zu beobachten. Will man dagegen eine hohe Ausbeute an Hybridomzellen erzielen, so eignet sich besser die geschlossene Helikalkammer. Diese besteht aus einem Plexiglasröhrchen, um welches die zylindrischen Elektroden im Sinne einer Doppelhelix parallel gewunden sind. Das Plexiglasröhrchen mit den Elektroden wird in einen zylindrischen Mantel, welcher die Zellsuspension enthält, langsam unter drehenden Bewegungen eingeführt, so daß die Zellen zwischen den Elektroden nach oben steigen.

Zur Fusion von Mäusemilzzellen mit Mäusemyelomzellen werden in der Literatur folgende Angaben zur Einstellung der elektrischen Parameter gemacht (Vienken und Zimmermann, 1985, Zimmermann et al., 1985, Vienken und Zimmermann, 1982, Vienken et al., 1983, Anleitung des Gerätes):

Zellausrichtungsfrequenz: 500- 1500 kHz

Zellausrichtungsspannung: 100- 333 V/cm

Ausrichtungszeit : 10- 30 Sekunden

Impulsdauer : 10- 50 Mikrosekunden

Alignement Off Time : 10 Millisekunden

Anzahl der Impulse : 1- 3
Zeit zwischen d. Impulsen : 1,0 Sekunden
Fusionsspannung : 2,0- 4,0 kV/cm
Ausrichtungsfeld nach der Fusion:
30- 60 Sekunden

Von großer Bedeutung bei der Elektrofusion von Zellen ist aber auch die Zusammensetzung der verwendeten Medien, die herrschende Temperatur und die verwendete Zelldichte.

Zimmermann et al. beschreiben, daß es, wenn man Medien mit einem hohen Elektrolytgehalt, d.h. mit einer guten Leitfähigkeit verwenden würde, beim Anlegen des elektrischen Feldes zu einer starken lokalen Hitzeentwicklung käme. Dadurch würden Turbulenzen entstehen, die die in Ketten angeordneten Zellen auseinanderreißen würden. Außerdem kann die lokale Hitzeentwicklung die Fusion verhindern, weil der Abdichtungsprozeß der Einzelzellmembran bei höheren Temperaturen schneller stattfindet als der Prozeß der Brückenbildung der Membranen zweier benachbarter Zellen (Zimmermann et al., 1985, Zimmermann et al., 1984a). Um diese negativen Einflüsse auf die Fusion zu vermeiden, gibt es mehrere Möglichkeiten. Man kann das Medium oder die Elektroden während der Fusion kühlen (Zimmermann et al., 1985, Zimmermann et al., 1984a), die Funktionsperiode der Zellausrichtung reduzieren (duty cycle), den Membrandurchbruch kombinieren mit einer Zentrifugation (kein Zellausrichtungsfeld anlegen), die Magnetoelektrofusionstechnik benutzen oder Medien verwenden, die wenig oder keine Elektrolyte

(Zuckerlösungen) besitzen (Zimmermann et al., 1985).

Vienken und Zimmermann (1985) geben folgende Zusammensetzung eines bewährten Fusionsmediums für die Elektrofusion an:

280 mM Inositol, 1mM Phosphatpuffer (K_2HPO_4 , KH_2PO_4), 0,5 mM Magnesiumazetat und 0,1 mM Kalziumazetat.

Nach der Fusion inkubieren sie die Zellen noch zehn Minuten bei 37° C in diesem Medium, bevor sie die Hybridome in dem sogenannten "post-fusion-medium" mit höherem Elektrolytgehalt und dafür ohne Zucker aufnehmen. Dieses Medium, in dem sie die Zellen 30 Minuten bei 37° C inkubieren hat folgende Zusammensetzung:

132 mM NaCl, 8 mM KCl, 10 mM Phosphatpuffer, 0,5 mM Magnesiumazetat und 0,1 mM Kalziumazetat.

Erst nach der letzten Inkubation nehmen sie die Zellen in einem Selektivnährmedium auf.

Wenn man von der Zusammensetzung der Medien einmal absieht, ist es prinzipiell gleich, bei welcher Temperatur zwischen 4° C und 37° C man fusioniert. Man muß nur beachten, daß sich die Membranen bei 37° C schneller erholen (Sekunden bis Minuten) als bei 4° C (30 Minuten bis zu Stunden) (Kuta et al., 1985, Zimmermann et al., 1984a), so daß es sich empfiehlt, die Zellsuspension direkt nach der Fusion auf 37° C zu erwärmen.

Die Zellfusion wird weiterhin beeinflusst von der verwendeten Zellsuspensionsdichte. Bei geringer Zelldichte kommt es bevorzugt zur Verschmelzung

zweier Einzelzellen, während eine sehr hohe Zelldichte und ein entsprechend hoher elektrischer Impuls durch die sogenannte dreidimensionale Fusion (Zellen einer Kette verschmelzen mit Zellen der Nachbarkette) zur Bildung von Riesenzellen führt (Zimmermann et al., 1985).

Am Anfang der Elektrofusion von Zellen hat man der Zellsuspension vor der Fusion Pronase (1 mg/ml) oder Dispase (10 µg/ml) zugefügt. Diese Enzyme erleichterten oft die Elektrofusion von Zellen, indem sie die Feldstabilität der Zellen erhöhten. Man hat sich die Wirkung der Enzyme so erklärt, daß es zu einer partiellen Degeneration einiger integrierter Membranproteine kommt, wodurch die verbleibenden Proteine beweglicher werden. Diese Mobilitäts-erhöhung könnte das Auftauchen von proteinfreien Lipiddomänen im elektrischen Feld begünstigen, was die Elektrofusion erleichtert und die Feldstabilität erklärt (Zimmermann, 1982, Zimmermann und Vienken, 1982, Vienken et al., 1983). Später hat man entdeckt, daß man auf die Vorbehandlung der Zellen mit Pronase oder Dispase zur Fusion von Säugerzellen verzichten kann (Vienken et al., 1983).

2.3.4. Vorteile der Elektrofusion, Anwendungsbereich und Bedeutung für die Zukunft

Für die neue Technik der Elektrofusion von Zellen werden in der Literatur folgende Vorteile gegenüber der alten Techniken angegeben:

- Bei der Elektrofusion kann man den Fusionsschritt unter dem Mikroskop beobachten (Zimmermann, 1983);
- Man kann die Anzahl der Zellen, die fusionieren sollen, vorherbestimmen anhand der verwendeten Zellsuspensionsdichte und die Stärke des elektrischen Feldes und der Impulse. Eine geringe Zelldichte oder ein schwaches elektrisches Feld führen bevorzugt zu Zweizellformationen, während eine hohe Zelldichte und stärkere elektrische Impulse zur Fusion tausender von Zellen führen kann (Bildung sogenannter Riesenzellen) (Zimmermann und Vienken, 1982, Zimmermann, 1983);
- Der Fusionsprozeß läuft bei allen dem elektrischen Impuls ausgesetzten Zellen gleichzeitig ab (Zimmermann, 1983);
- Die Ausbeute an Plasmogamie ist sehr hoch (bis zu 80% bis 100%), was auch zu einer höheren Ausbeute an Karyogamie führt (Zimmermann, 1983), wobei die Ausbeute an Hybridomzellen um das zehnfache höher ist als bei der Fusion mit Polyäthylenglykol (Kuta et al., 1985);
- Die Lebensfähigkeit der fusionierten Zellen ist ausgezeichnet (Zimmermann, 1983);
- Die Elektrofusion von Zellen ist ein rein physikalisches Geschehen, wobei man auf toxische Substanzen jeglicher Art verzichten kann (Finaz et al., 1984, Zimmermann et al., 1980a).

Der elektrische Durchbruch von Zellmembranen kann außer zur Elektrofusion von Zellen auch noch zum Freisetzen intrazellulärer Substanzen, z.B. Aminosäuren, Hormone und sogar Proteine, angewendet werden; außerdem zur Einkapselung fremden Materials in die Zelle, z.B. Arzneimittel in Erythrozyten und Lymphozyten (Zimmermann et al., 1980b) oder Proteine und DNA (Plasmide) in Zellen und zur Sterilitätskontrolle (Zimmermann et al., 1985).

Die Elektrofusion selbst kann auf alle lebenden Zellen und auf Liposomen angewendet werden (Arnold und Zimmermann, 1984). Man kann also Zellen einer Spezies, Zellen verschiedener Spezies und Tierzellen mit Pflanzenzellen (sogenannte cross-kingdom fusion) fusionieren (Kuta et al., 1985). Es lassen sich Hybride aus zwei Zellen bilden oder aus hunderten von Zellen. Diese sogenannten Riesenzellen eignen sich sehr gut zum Studium lebender Membransysteme, da sie groß genug sind um Mikroelektroden und Mikrokapillaren einzuführen (Zimmermann et al., 1982).

Durch die genannten Vorteile und Möglichkeiten des Einsatzes der Elektrofusion von Zellen gewinnt diese immer größere Bedeutung auf den Gebieten der Membranforschung, Medizin, Biotechnologie und im Ackerbau (Zimmermann et al., 1984a)

Ein ganz neuer Aspekt in der Erzeugung von antikörperproduzierenden Hybridomzellen stellt die Rotation der Einzelzelle im rotierenden elektrischen Feld dar. Dieses Phänomen wurde schon für Pflanzenzellen, Erythrozyten und Hefezellen beschrieben (Arnold und Zimmermann, 1982, Zimmermann, 1982,

Arnold und Zimmermann, 1984). Man will nun versuchen anhand der Rotation im rotierenden elektrischen Feld solche B-Lymphozyten zu erkennen, die spezifische Antikörper produzieren (mündliche Mitteilung, Arnold, 1986). Würde das gelingen, könnte man diese selektierten B-Lymphozyten gezielt mit Myelomzellen mittels der Elektrofusion verschmelzen und hätte dann sofort, ohne den umständlichen Weg der Zellklonierung gehen zu müssen, monoklonale antikörperproduzierende Hybridomzellen.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Kultivierung von Myelomzelllinien

Sowohl für die Fusionen mittels Polyäthylenglykol als auch für die Elektrofusionen wurde die Myelomzelllinie X63-Ag8.653 verwendet. Die Zellen wurden in 175 cm² Zellkulturflaschen in 80 ml des folgenden Mediums gezüchtet:

Dulbecco-MEM (Mayr et al., 1974), dem pro Liter zusätzlich zugesetzt wurde: 15% fetales Kälberserum, 20 ml Natriumbicarbonat (8,8%ig), 10 ml MEM IV, 10 ml nichtessentielle Aminosäuren, 0,5 ml Penicillin (100.000 I.E./l), 0,5 ml Streptomycin (100 mg/ml), 1,0 ml Bykomycin, 1,0 Amphotericin B, 40 µl Mercaptoäthanol (1:10).

Das fetale Kälberserum wurde vor der Verwendung 30 Minuten lang bei 56° C (Wasserbad) inaktiviert.

Die Myelomzellen wurden im Brutschrank bei 37° C Temperatur und 5% CO₂ Begasung vermehrt. Alle zwei bis drei Tage wurden sie im Verhältnis 5:1 geteilt.

3.1.2. Antigenherstellung

3.1.2.1. Virusantigen

Als Antigen zur Immunisierung der Mäuse wurde modifiziertes Vacciniavirus, Stamm Ankara (MVA) 577. Passage auf FHE-Zellen (Mayr et al., 1978) und Bovines Coronavirus (BCV) V 270/83 (Lu, 1985) verwendet.

3.1.2.2. Virusvermehrung

Das MVA-Virus wurde in primären FHE-Zellen und in MA 104-Zellen vermehrt. Die Zellen wurden, sobald sie einen dichten Zellrasen gebildet hatten, mit MVA-Virus (Zellkulturmaterial, 2 ml/Rouxflasche, 4 ml/Penicillinkolben, 6 ml/Rollerflasche) infiziert. Dies war etwa vier Tage nach dem Ansatz der Zellen der Fall. Bei einem deutlichen cytopathischen Effekt von etwa 80% (nach etwa drei bis vier Tagen) wurden die infizierten Zellen gefriergetaut ($-20^{\circ}/25^{\circ}$ C).

3.1.2.3. Virusreinigung

Die gefriergetauten Zellen wurden in der Kühlzentrifuge 90 Minuten lang bei 11.000 UpM zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und das Sediment in Tris-Puffer (1 mM, pH 9) aufgenommen. Es wurden pro 250 ml Zentrifugenbecher 5 ml Tris-Puffer verwendet. Die gut suspendierten Sedimente wurden in einem Meßzylinder vereinigt und die gleiche Menge Fluorcarbon hinzugefügt. Diese Mischung wurde kurz beschallt und mit dem Ultraturrax gut vermischt. Danach wurde im 45 ml Zentrifugenbecher 20 Minuten lang bei 3000 UpM zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen aus. Die obere Phase, Fc-1 genannt, enthielt das Virus, die mittlere bestand aus Zelltrümmern und die untere Phase wurde von dem Fluorcarbon gebildet. Das Fc-1 Material wurde später zur Beschichtung der ELISA-Platten verwendet.

Nach dem vorsichtigen Absaugen der oberen Phase (Fc-1), wurden die verbliebenen Zelltrümmer und das Fluorcarbon erneut in einem Meßzylinder vereinigt

und mit der gleichen Menge Tris-Puffer ergänzt. Dann wurde wieder beschallt, mit dem Ultraturrax gut gemischt und erneut zentrifugiert, so daß man als obere Phase Fc-2 erhielt. Schließlich wurde durch Wiederholung der genannten Vorgänge auch noch Fc-3 gewonnen.

Zur weiteren Virusreinigung wurden Fc-1, Fc-2 und Fc-3 vereinigt und durch ein Sucrosekissen in einem Beckmann SW 28-Rotor 90 Minuten lang bei 25.000 UpM und 4° C zentrifugiert. Die Zentrifugenröhrchen wurden dazu nur etwa zur Hälfte mit dem Virusmaterial gefüllt. Dieses wurde dann mit 10 ml Sucroslösung (36% wt/vol in Tris-Puffer) unterschichtet und anschließend austariert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und die Zentrifugenröhrchen um das entstandene Viruspellet herum vorsichtig trocken gesaugt. Auf jedes Pellet wurden 0,5 ml Tris-Puffer gegeben und über Nacht weichen gelassen.

Der letzte Schritt der Virusreinigung war die Gradientenzentrifugation. Dazu wurde das in Tris-Puffer aufgenommene Virusmaterial durch einen Sucrosegradienten, der von 20% bis 60% eingestellt war, in einem Beckmann SW 56- oder SW 60-Rotor 45 Minuten lang bei 10.000 UpM und 4° C zentrifugiert (Sucroslösungen: wt/vol in Tris-Puffer). Die beiden erhaltenen Banden wurden durch Punktion vorsichtig abgenommen und 90 Minuten lang bei 35.000 UpM und 4° C in einem Beckmann SW 56- oder SW 60-Rotor eingengt. Sowohl die obere als auch die untere Bande waren zur Immunisierung der Mäuse geeignet.

Die Vermehrung und Reinigung von BCV-Virus wurde nach der von Czerny (1986) beschriebenen Methode durchgeführt.

3.1.2.4. Virustitration

Das MVA-Virus wurde auf 96-Loch Mikrozellkulturplatten mit Flachboden austitriert. Dazu wurden für Zellkulturvirus Verdünnungsreihen von 10^{-1} bis 10^{-11} und für Gradientenvirus solche von 10^{-2} bis 10^{-12} angelegt, in die Plattenvertiefungen eingefüllt und zuletzt Hühnerembryofibroblastenzellen zugegeben. Nach sieben Tagen wurde die Titration abgelesen. Plattenvertiefungen, in denen der Zellrasen nicht ausgebildet wurde oder einen deutlichen cytopathischen Effekt zeigte, wurden als positiv bewertet. Die KID_{50} wurde nach Kaerber errechnet.

3.1.3. Immunisierung der Mäuse

Zur Immunisierung wurden mindestens zehn Wochen alte BALB/c-Mäuse verwendet. Diese wurden mehrmals immunisiert mit 0,1 - 0,2 ml Zellkultur- oder Gradientenvirus, versetzt mit der gleichen Menge Freund'schem Adjuvans. Das Antigen wurde intraperitoneal verabreicht. Die Mäuse erhielten drei bis vier Tage vor der Fusion die letzte Boosterinjektion, wobei 0,05 ml Gradientenvirus ohne Zusatz von Freund'schem Adjuvans intravenös und 0,05 bis 0,2 ml i.p. appliziert wurden.

3.1.4. Zellfusion mittels Polyäthylenglykol und Elektrofusion

Für beide Methoden der Zellfusion wurden sowohl die Milzzellen als auch die Myelomzellen in der gleichen Art vorbereitet.

3.1.4.1. Aufbereitung der Milz

Einer durch zervikale Dislokation getöteten und enthäuteten immunisierten BALB/c-Maus wurde unter sterilen Bedingungen die Milz entnommen. Diese wurde in Dulbecco-MEM mit den auf Seite 31 beschriebenen Zusätzen aber ohne fetalem Kälberserum gewaschen, zerkleinert (in ca. 5 Stücke) und mit dem Stempel einer 10 ml Spritze unter ständiger Mediumzugabe (ca. 10 ml) durch ein Netz (Porenweite 60 Micron) passiert. Die so entstandene Milzzellsuspension wurde in einen konischen 45 ml Zentrifugenbecher überführt und etwa eine Minute stehen gelassen. Der Überstand wurde in einen zweiten Zentrifugenbecher pipettiert, während das Sediment mit ca. 10 ml Medium suspendiert und erneut ca. eine Minute stehen gelassen wurde. Der Überstand wurde zum ersten dazugegeben und 10 Minuten lang bei 1000 UpM zentrifugiert. Nachdem der Überstand vorsichtig abgesaugt worden war wurde das Pellet zur Lysis der Erythrozyten mit 2 ml einer Tris-NH₄Cl-Lösung (0,017 M Tris und 0,16 M NH₄Cl, pH 7,2) suspendiert. Nach zwei Minuten wurden ca. 10 ml BUW-8401 Fusionsmedium (GCA Corporation) hinzugefügt und erneut 10 Minuten lang bei 1000 UpM zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in genau 10 ml

BUW-8401 Fusionsmedium aufgenommen, gut suspendiert und 0,1 ml davon nach Vitalfärbung mit Trypanblau in einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer ausgezählt. Danach konnten die Milzzellen auf die gewünschte Zellzahl eingestellt werden.

3.1.4.2. Vorbereitung der Myelomzellen

Zur Fusion wurden nur Myelomzellen (X63-Ag8.653) verwendet, die sich in logarithmischer Wachstumsphase befanden. Einige Stunden vor der Fusion wurden sie mit frischem Dulbecco-MEM-Medium mit den auf Seite 31 beschriebenen Zusätzen und 20% fetalem Kälberserum versorgt. Zur Gewinnung der Zellen für die Fusion wurden diese mit Dulbecco-MEM-Medium ohne fetalem Kälberserum von der Wand der Zellkulturflasche abgeschüttelt, in einen konischen 45 ml Zentrifugenbecher überführt und 10 Minuten lang bei 1000 UpM zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 10 ml BUW-8401 Fusionsmedium aufgenommen und auf die gleiche Weise zentrifugiert. Zu diesem Zellpellet wurden genau 10 ml BUW-8401 Fusionsmedium gegeben, gut suspendiert und 0,1 ml davon ausgezählt (vgl. Milzzellen). Danach konnten die Myelomzellen auf die gewünschte Zellzahl eingestellt werden. Die Milz- und Myelomzellen wurden dann zusammen suspendiert und acht Minuten lang bei 800 UpM zentrifugiert. Danach war die weitere Behandlung der Zellen für die Fusion mittels PEG und für die Elektrofusion unterschiedlich, weshalb sie bei der jeweiligen Fusionstechnik beschrieben wird.

3.1.4.3. Fusion mittels Polyäthylenglykol

Die im Verhältnis 4:1 eingestellten Milz- und Myelomzellen wurden zentrifugiert und anschließend um das Zellpellet herum sorgfältig mit einer Pasteurpipette trocken gesaugt. Dann wurde das Pellet mit 1 ml der 40%igen PEG 4000-Lösung (mit 15% Dimethylsulfoxid) (Merck) vorsichtig suspendiert. Nach einminütiger Einwirkungszeit wurde 1 ml serumfreies Dulbecco-Medium zugegeben. Nach einer weiteren Minute wurden 2 ml serumfreies Medium zugefügt und nach zwei Minuten schließlich die Fusion mit Dulbecco-MEM mit 20% fetalem Kälberserum gestoppt. Die Zellen wurden in Dulbecco-HAT-Medium mit 20% fetalem Kälberserum aufgenommen und auf 96-Loch-Mikroplatten mit Flachboden verteilt, wobei Makrophagen als feeder layer-Zellen zugefügt worden waren. Die Bebrütung der Zellen erfolgte bei 37° C und 5% CO₂-Begasung. Jede Woche einmal wurde pro Vertiefung die Hälfte des Mediums gewechselt. Nach vierzehntägiger Bebrütung, wenn alle nicht fusionierten Milz- und Myelomzellen abgestorben waren, wurde auf HT-Medium gewechselt.

3.1.4.4. Elektrofusion

Das Pellet der im Verhältnis 5:1 eingestellten und zentrifugierten (siehe oben) Milz- und Myelomzellen wurde in BUW-8401 Fusionsmedium aufgenommen. Zur Fusion wurde das Gerät Zimmermann cell Fusion™ System (Beschreibung im Literaturteil) mit einer Helikalkammer und mehreren flachen Kammern benützt. Die Helikalkammer wurde mit 200µl und die flache

Kammer mit 14µl Zellsuspension beschickt. Näheres über die eingestellte Zellzahl, die Arbeitstemperatur, die Einstellung des Gerätes und die Behandlung der Zellen nach der Fusion wird im Ergebnisteil beschrieben.

3.1.5. Nachweis von Antikörpern in Hybridomakultur- überständen

Etwa vierzehn Tage nach der Fusion waren aus den fusionierten Zellen größere Kolonien herangewachsen. Zu diesem Zeitpunkt wurde damit begonnen, ihr Medium auf spezifische Antikörper zu prüfen. Dazu wurden insbesondere der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) aber auch der Hämagglutinationshemmungstest und der Neutralisationstest eingesetzt.

3.1.5.1. Enzyme-linked immunosorbent assay

Für die Beschichtung der ELISA-Platten (Immunolon II, Nunc, Wiesbaden) wurde Fc-1 Material des MVA-Virus und sedimentiertes BCV-Virus verwendet.

Der ELISA wurde als indirekter Nachweis mit Anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat (Dako, Hamburg) durchgeführt. Techniken und Details finden sich bei Hübert (1985) und Lu (1985).

3.1.5.2. Neutralisationstest und Hämagglutinations- hemmungstest

Der Neutralisationstest wurde nach der von Czerny (1986) und der Hämagglutinationshemmungstest nach

der von Lu (1985) beschriebenen Methode durchgeführt.

3.1.6. Isolierung von antikörperproduzierenden Hybridomas und deren Klonierung

Die Isolierung und Klonierung mit der Endverdün-
nungstechnik von antikörperproduzierenden Hybridom-
zellen wurde wie von Czerny (1986) ausführlich be-
schrieben durchgeführt.

3.2. Versuche und Ergebnisse

3.2.1. Immunisierung der Mäuse

Die Mäuse wurden mit MVA-Zellkulturvirus der 577. Passage auf FHE (10^6 KID₅₀/0,05 ml) grundimmunisiert. Geboostert wurden sie insgesamt sechsmal und zwar alle 14 Tage mit MVA-Gradientenvirus der 577. Passage auf FHE (10^8 KID₅₀/0,05ml).

Eine Maus wurde mit BCV V 270/83-Zellkulturvirus der 15. Passage in fetalen Kälberlungenzellen (HA-Titer 1:128) grundimmunisiert und sechsmal im Abstand von 14 Tagen mit BCV V 270/83-Gradientenvirus der 17. Passage in fetalen Kälberlungen (HA-Titer: 1:10240) geboostert.

3.2.2. Fusion mittels Polyäthylenglykol

3.2.2.1. Verwendete Zellzahl

Die verwendeten Milz- und Myelomzellen wurden im Verhältnis 4:1 eingestellt. Dazu wurden $12,0 \times 10^7$ Milz- und $4,0 \times 10^7$ Myelomzellen verwendet.

3.2.2.2. Fusion mittels Polyäthylenglykol und Ergebnisse

Insgesamt wurden vier Fusionen mittels PEG parallel mit Elektrofusionen durchgeführt, d.h. für beide Fusionsarten wurden die Milzzellen der gleichen immunisierten Maus verwendet. Drei Fusionen (No. 1, 2 und 3) wurden mit Milzzellen von MVA-immunisierten

Mausen und eine Fusion (No. 4) mit Milzzellen von einer BCV-immunisierten Maus durchgeführt. Nach den jeweiligen Fusionen wurden die Zellen in 6 (Fusionen No. 1, 2 und 3) bzw. 8 (Fusion No. 4) 96-Loch-Mikroplatten eingesät. Für die Fusionen No. 1, 2 und 3 standen also jeweils 576 Löcher für Koloniewachstum zur Verfügung. Durchschnittlich waren in 491 Löchern eine oder mehrere Kolonien herangewachsen, was einer Ausbeute von 85% entspricht. Die Überstände der bewachsenen Löcher wurden im Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), in der Hämagglutinationshemmungsreaktion (HAH) und im Neutralisationstest (NT) auf spezifische Antikörper getestet. Während die Ergebnisse der HAH und des NT negativ waren, konnten im ELISA Überstände mit spezifischen Antikörpern gefunden werden. Die Ausbeute betrug durchschnittlich 5,3%. Folgende Ergebnisse wurden im einzelnen erhalten:

Fusion No. 1: Koloniewachstum in 475 Löchern
(82,5%) davon 13 ELISA-positiv (2,7%)
Fusion No. 2: Koloniewachstum in 502 Löchern
(87,2%) davon 16 ELISA-positiv (3,2%)
Fusion No. 3: Koloniewachstum in 496 Löchern
(86,1%) davon 49 ELISA-positiv (9,9%)

Die Fusion No. 4 (Zellen von BCV-immunisierter Maus) brachte folgende Ergebnisse:
Von 768 zur Verfügung stehenden Löchern war in 52 (6,8%) Koloniewachstum vorhanden. Auch hier brachten die HAH und der NT keine positiven Ergebnisse. Im ELISA waren die Überstände von 22 Löchern positiv, was einer Ausbeute von 42,3% entspricht.

Die Überstände der ELISA-positiven Löcher wurden noch mehrmals im ELISA getestet, so daß die Kolonien, die ihre Antikörperproduktion inzwischen eingestellt hatten oder solche Kolonien, die sogenannte "sticky antibodies" (Hübert, 1985) produzierten, eliminiert werden konnten. Erst dann wurden die ELISA-positiven Kolonien isoliert und kloniert.

3.2.3. Elektrofusion

3.2.3.1. Verwendete Zellzahl

Zur Elektrofusion wurden die Milz- und Myelomzellen immer im Verhältnis 5:1 eingestellt. Bei 67 der insgesamt 83 Fusionen wurden dabei 2×10^7 Milzzellen und 4×10^6 Myelomzellen pro Milliliter verwendet und bei 16 Fusionen $8,8 \times 10^6$ Milzzellen und $2,2 \times 10^6$ Myelomzellen pro Milliliter. Bei 58 Fusionen wurden die Erythrozyten zuvor mit Ammoniumchlorid lysiert.

3.2.3.2. Einstellung des Gerätes

Für die Elektrofusionen wurde das Gerät Zimmermann Cell FusionTM System benutzt. Bei allen 83 durchgeführten Fusionen wurde die Zellausrichtungsspannung auf 5 Volt, die "Between Pulse Alignment Off Time" (A.O.T.) auf 10 Millisekunden und die Zeit zwischen den Impulsen auf eine Sekunde eingestellt. Die Zellausrichtungsfrequenz betrug bei 77 Fusionen 1000 kHz und bei 6 Fusionen 1500 kHz. Der "Duty cycle" wurde bei 47 Fusionen 100% gewählt, bei 6 Fusionen 50%, bei 24 Fusionen 20% und bei 6 Fusionen 10%.

Bei 63 Fusionen wurden die Zellen 30 Sekunden lang im Zellausrichtungsfeld belassen, bei 18 Fusionen 40 Sekunden lang, bei jeweils einer Fusion 45 und 68 Sekunden lang. Die Impulsdauer betrug bei einer Fusion 10 Mikrosekunden, bei 80 Fusionen 15 μ s und bei 2 Fusionen 20 μ s. Die Anzahl der Impulse wurde zwischen eins und drei gewählt, wobei 16 Fusionen mit einem Impuls, 33 mit 2 Impulsen und 34 mit 3 Impulsen durchgeführt wurden. Die Fusionsspannung wurde bei 2 Fusionen auf 40 Volt, bei 79 Fusionen auf 60 Volt und bei 2 Fusionen auf 70 Volt eingestellt. Nach der Fusion wurde das Zellausrichtungsfeld noch zwischen 30 und 150 Sekunden aufrechterhalten und zwar mit folgender Verteilung: 30 Sekunden lang: 27 Fusionen, 60 Sekunden lang: 38 Fusionen, 90, 120 und 150 Sekunden lang: jeweils 6 Fusionen.

3.4.2.3. Verwendete Kammer

Bei 11 Fusionen wurde die geschlossene Helikalkammer verwendet und bei 72 Fusionen die offene flache Kammer. Beide Kammern hatten einen Elektrodenabstand von 200 μ m.

3.4.2.4. Allgemeine Kriterien

Nachdem die anfangs durchgeführten Fusionen nicht zu dem gewünschten Erfolg führten, wurde versucht durch Änderung der Parameter während und nach der Fusion die erwartete Ausbeute an Hybridomzellen zu erhalten. Dazu wurde das Fusionsmedium (BUW-8401) bei 77 Fusionen auf 37° C erwärmt, wobei bei 4 Fusionen die Helikalkammer während der Fusion in

ein 37° C warmes Wasserbad verbracht wurde. Sechs Fusionen wurden mit ca. 6° C kaltem Medium durchgeführt. Nach der Fusion wurden die Zellen in 65 Fällen nicht inkubiert, d.h. sie wurden sofort nach der Fusion in Einsaatmedium aufgenommen. Bei zwei Fusionen wurden die Zellen 10 Minuten lang bei 37° C im Fusionsmedium inkubiert. In ebenfalls zwei Fällen wurden die Zellen 10 Minuten lang in Fusionsmedium bei Zimmertemperatur und 30 Minuten lang in Nachfusionsmedium (post fusion medium, BUW-8402) inkubiert. Bei 14 Fusionen wurden die Zellen 10 Minuten lang bei 37° C im Fusionsmedium und 30 Minuten lang bei 37° C im Nachfusionsmedium inkubiert. Die Zellen aus der flachen Kammer wurden dann direkt in Einsaatmedium aufgenommen, während die Zellen aus der Helikalkammer zunächst 8 Minuten lang bei 800 Upm zentrifugiert und erst dann in Einsaatmedium aufgenommen wurden. Bei 81 Fusionen wurde Dulbecco-HAT als Einsaatmedium verwendet, bei 2 Fusionen wurden die Zellen zunächst mit Dulbecco-MEM eingesät und erst am nächsten Tag auf das Selektivmedium mit HAT umgestellt. Peritonealmakrophagen wurden bei 32 Fusionen dem Medium am gleichen Tag zugesetzt, bei 25 Fusionen ein Tag später, bei einer Fusion ein Tag vorher und bei 25 Fusionen 2 Tage vorher. Die Zellen wurden nach der Fusion in 96-Loch-Mikroplatten (Falcon) oder in 24-Loch-Platten (Flow Laboratories) eingesät. Von den insgesamt 11 Fusionen, die mit der Helikalkammer durchgeführt wurden, wurden bei 8 Fusionen die Zellen jeweils auf eine 96-Loch-Mikroplatte verteilt, bei einer Fusion wurden die Zellen in eine

24-Loch-Platte eingesät und bei 2 Fusionen wurden die Zellen jeweils in 3 Vertiefungen der 24-Loch-Platte verteilt. Von den insgesamt 72 Fusionen, die mit der offenen flachen Kammer durchgeführt wurden, wurden die Zellen von 17 Fusionen, bei denen alle Parameter gleich waren, auf zwei 96-Loch-Mikroplatten verteilt. Bei 6 Fusionen wurden die Zellen jeweils in eine Vertiefung der 96-Loch-Mikroplatte und bei 49 Fusionen jeweils in eine Vertiefung der 24-Loch-Platte eingesät.

3.2.4.5. Ergebnisse der Elektrofusion

Insgesamt wurden 83 Elektrofusionen durchgeführt, wobei elfmal die Helikalkammer und 72mal die flache Kammer benützt wurde. Die durchgeführten Fusionen und ihre Parameter sind in den Tabellen 1-6 zusammenfassend dargestellt.

Im Anschluß an 8 Fusionen konnte ein Koloniewachstum festgestellt werden. Fünf Fusionen davon wurden mit der Helikalkammer und drei mit der flachen Kammer durchgeführt.

Bei einer Fusion (Helikalkammer, H2) wuchsen innerhalb 10 Tagen nach der Fusion drei große Kolonien heran, die jedoch nicht auf Antikörperproduktion getestet werden konnten, da sie langsam abgestorben sind. Eine andere Fusion (Helikalkammer, H10), bei der es zum Koloniewachstum kam, war nach 5 Tagen bakteriell kontaminiert. Die Kolonien, die nach einer Fusion mit der flachen Kammer (F30) erhalten wurden, sind nach 6 Tagen langsam eingegangen. Bei den restlichen 5 Fusionen (3 in Helikalkammer, H7-9, 2 in flacher Kammer, F33) wuchsen Kolonien heran,

die sich im Aussehen stark von "echten" Hybridomzellkolonien (B-Lymphozyten x Myelomzellen) unterschieden, da die Zellen nicht rund sondern kubisch aussahen. Nach fünf Tagen begannen diese Zellen langsam abzusterben. Es wurde vermutet, daß es sich bei diesen Zellen um Fusionsprodukte von T-Lymphozyten und Myelomzellen gehandelt hat. Um dies zu beweisen wurde der Immunofluoreszenztest durchgeführt. Dazu wurden die Zellen auf einen Objektträger übertragen. Nachdem sie luftgetrocknet waren, wurden sie 10 Minuten mit kaltem Azeton (-18°C) fixiert, in PBS gewaschen und mit einem Tropfen Konjugat (Anti-T-Zell-Antikörper FITC-Konjugat) versehen. Nach 30-minütiger Inkubation in der feuchten Kammer bei 37°C wurden sie dreimal in PBS gewaschen. Danach wurde der Objektträger mit zwei Tropfen Glycerinphosphatpuffer versehen und eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte im Fluoreszenzmikroskop, erbrachte aber kein eindeutig positives Ergebnis.

Tab. 1 A

Fusionen Verwendete Zellzahl und Einstellung des Gerätes

No. n	Zellzahl x10 ⁶ /ml	Ausr. frequ. kHz	Duty cycle %	Ausr. zeit s	Impuls- dauer μs	Anzahl d. Imp.	Fusions- spannung V	Pre-Set s
H1 1	Milz 20 Myelom 4	1000	20	30	15	3	60	30
H2 1	Milz 20 Myelom 4	1000	100	30	15	3	60	60
H3 1	Milz 8,8 Myel.2,2	1500	100	30	20	3	70	30
H4 1	Milz 8,8 Myel.2,2	1000	100	30	15	3	60	60
H5 1	Milz 8,8 Myel.2,2	1000	100	30	15	3	60	60
H6 1	Milz 8,8 Myel.2,2	1000	100	30	15	3	60	60
H7 1	Milz 8,8 Myel.2,2	1000	100	30	15	3	60	60
H8 1	Milz 8,8 Myel.2,2	1500	100	30	15	3	60	60

Tab. 1 B Behandlung während und nach der Fusion

No.	Fusions- temp. °C	Inkubation nach Fusion	Einsaat- medium	Zelleinsaat in	Makrophagen- zugabe	Sonstiges
H1	37	10' FM Brutschr. 37°	Dulbecco- HAT	96-Loch- platte	einen Tag später	/
H2	37	10' FM Brutschr. 37°	Dulbecco- HAT	96-Loch- platte	zwei Tage vorher	Erythrozyten nicht lys.
H3	37	10' FM, 30' NM Brutschr. 37°	Dulbecco- HAT	23 Vertief. 24-Lochpl.	gleich- zeitig	/
H4	37	10' FM, 30' NM Brutschr. 37°	Dulbecco- HAT	95 Vertief. 96-Lochpl.	gleich- zeitig	/
H5	37	10' FM, 30' NM Brutschr. 37°	Dulbecco- HAT	94 Vertief. 96-Lochpl.	gleich- zeitig	/
H6	6	10' FM, 30' NM Brutschr. 37°	Dulbecco- HAT	95 Vertief. 96-Lochpl.	gleich- zeitig	/
H7	6	10' FM, 30' NM Brutschr. 37°	Dulbecco- HAT	94 Vertief. 96-Lochpl.	gleich- zeitig	Kammer mit PBS gespült
H8	37 Wasserb.	10' FM, 30' NM Wasserbad 37°	Dulbecco	96-Lochpl.	gleich- zeitig	Dulb.-HAT 1 Tag später

Tab. 2 A

Fusionen Verwendete Zellzahl und Einstellung des Gerätes

No.	n	Zellzahl x10 ⁶ /ml	Ausr. frequ. kHz	Duty cycle %	Ausr. zeit s	Impuls- dauer μs	Anzahl d. Imp.	Fusions- spannung V	Pre-Set s
H9	1	Milz 8,8 Myel. 2,2	1500	100	30	15	3	60	60
H10	1	Milz 8,8 Myel. 2,2	1500	100	30	15	3	40	60
H11	1	Milz 8,8 Myel. 2,2	1500	100	40	10	3	40	60
F1	17	Milz 20 Myel. 4	1000	20	40	15	2	60	60
F2	2	Milz 20 Myel. 4	1000	10	30	15	1	60	30
F3	2	Milz 20 Myel. 4	1000	20	30	15	1	60	30
F4	2	Milz 20 Myel. 4	1000	50	30	15	1	60	30
F5	2	Milz 20 Myel. 4	1000	100	30	15	1	60	30

Tab. 2 B Behandlung während und nach der Fusion

No.	Fusions- temp. °C	Inkubation nach Fusion	Einsaats- medium	Zelleinsaat in	Makrophagen- zugabe	Sonstiges
H9	37 Vasserb.	10' FM, 30' NM Wasserbad 37°.	Dulbecco- HAT	96-Lochpl.	gleich- zeitig	/
H10	37 Vasserb.	10' FM, 30' NM Wasserbad 37°.	Dulbecco- HAT	3 Vertief. 24-Lochpl.	gleich- zeitig	nach 5 Tagen unsteril
H11	37 Vasserb.	10' FM, 30' NM Wasserbad 37°.	Dulbecco	3 Vertief. 24-Lochpl.	ein Tag vorher	Dulb.-HAT 1 Tag später
F1	37	keine	Dulbecco- HAT	zwei 96-Lochpl.	gleich- zeitig	/
F2	37	keine	Dulbecco- HAT	Je 1 Vert. 24-Lochpl.	ein Tag später	/
F3	37	keine	Dulbecco- HAT	Je 1 Vert. 24-Lochpl.	ein Tag später	/
F4	37	keine	Dulbecco- HAT	Je 1 Vert. 24-Lochpl.	ein Tag später	/
F5	37	keine	Dulbecco- HAT	Je 1 Vert. 24-Lochpl.	ein Tag später	/

Tab. 3 A

Fusionen Verwendete Zellzahl und Einstellung des Gerätes

No.	n	Zellzahl x10 ⁶ /ml	Ausr. frequ. kHz	Duty cycle %	Ausr. zeit s	Impuls- dauer μ s	Anzahl d. Imp.	Fusions- spannung V	Pre-Set s
F6	2	Milz 20 Myel. 4	1000	10	30	15	2	60	30
F7	2	Milz 20 Myel. 4	1000	20	30	15	2	60	30
F8	2	Milz 20 Myel. 4	1000	50	30	15	2	60	30
F9	2	Milz 20 Myel. 4	1000	100	30	15	2	60	30
F10	2	Milz 20 Myel. 4	1000	10	30	15	3	60	30
F11	2	Milz 20 Myel. 4	1000	20	30	15	3	60	30
F12	2	Milz 20 Myel. 4	1000	50	30	15	3	60	30
F13	2	Milz 20 Myel. 4	1000	100	30	15	3	60	30

Tab. 3 B Behandlung während und nach der Fusion

No.	Fusions- temp.	Inkubation nach Fusion	Einsaat- medium	Zelleinsaat in	Makrophagen- zugabe	Sonstiges
F6	37	keine	Dulbecco- HAT	je 1 Vert. 24-Lochpl.	ein Tag später	/
F7	37	keine	Dulbecco- HAT	je 1 Vert. 24-Lochpl.	ein Tag später	/
F8	37	keine	Dulbecco- HAT	je 1 Vert. 24-Lochpl.	ein Tag später	/
F9	37	keine	Dulbecco- HAT	je 1 Vert. 24-Lochpl.	ein Tag später	/
F10	37	keine	Dulbecco- HAT	je 1 Vert. 24-Lochpl.	ein Tag später	/
F11	37	keine	Dulbecco- HAT	je 1 Vert. 24-Lochpl.	ein Tag später	/
F12	37	keine	Dulbecco- HAT	je 1 Vert. 24-Lochpl.	ein Tag später	/
F13	37	keine	Dulbecco- HAT	je 1 Vert. 24-Lochpl.	ein Tag später	/

Tab. 4 A

Fusionen Verwendete Zellzahl und Einstellung des Gerätes

No. n	Zellzahl x10 ⁶ /ml	Ausr. frequ. kHz	Duty cycle %	Ausr. zeit s	Impuls- dauer μs	Anzahl d. Imp.	Fusions- spannung V	Pre-Set s
F14 1	Milz 20 Myel. 4	1000	100	30	15	3	60	150
F15 1	Milz 20 Myel. 4	1000	100	68	15	3	60	150
F16 2	Milz 20 Myel. 4	1000	100	30	15	3	60	120
F17 2	Milz 20 Myel. 4	1000	100	30	15	3	60	90
F18 2	Milz 20 Myel. 4	1000	100	30	15	3	60	60
F19 1	Milz 20 Myel. 4	1000	100	45	15	2	60	150
F20 1	Milz 20 Myel. 4	1000	100	30	15	2	60	150
F21 2	Milz 20 Myel. 4	1000	100	30	15	2	60	120

Tab. 4 B Behandlung während und nach der Fusion

No.	Fusions- temp. °C	Inkubation nach Fusion	Einsaat- medium	Zelleinsaat in	Makrophagen- zugabe	Sonstiges
F14	37	keine	Dulbecco- HAT	1 Vertief. 24-Lochpl.	zwei Tage vorher	Erythrozyten nicht lys.
F15	37	keine	Dulbecco- HAT	1 Vertief. 24-Lochpl.	zwei Tage vorher	Erythrozyten nicht lys.
F16	37	keine	Dulbecco- HAT	je 1 Vert. 24-Lochpl.	zwei Tage vorher	Erythrozyten nicht lys.
F17	37	keine	Dulbecco- HAT	je 1 Vert. 24-Lochpl.	zwei Tage vorher	Erythrozyten nicht lys.
F18	37	keine	Dulbecco- HAT	je 1 Vert. 24-Lochpl.	zwei Tage vorher	Erythrozyten nicht lys.
F19	37	keine	Dulbecco- HAT	1 Vertief. 24-Lochpl.	zwei Tage vorher	Erythrozyten nicht lys.
F20	37	keine	Dulbecco- HAT	1 Vertief. 24-Lochpl.	zwei Tage vorher	Erythrozyten nicht lys.
F21	37	keine	Dulbecco- HAT	je 1 Vert. 24-Lochpl.	zwei Tage vorher	Erythrozyten nicht lys.

Tab. 5 A

Fusionen Verwendete Zellzahl und Einstellung des Gerätes

No. n	Zellzahl x10 ⁶ /ml	Ausr. frequ. kHz	Duty cycle %	Ausr. zeit s	Impuls- dauer μs	Anzahl d. Imp.	Fusions- spannung V	Pre-Set s
F22 2	Milz 20 Myel. 4	1000	100	30	15	2	60	90
F23 2	Milz 20 Myel. 4	1000	100	30	15	2	60	60
F24 2	Milz 20 Myel. 4	1000	100	30	15	1	60	150
F25 2	Milz 20 Myel. 4	1000	100	30	15	1	60	120
F26 2	Milz 20 Myel. 4	1000	100	30	15	1	60	90
F27 2	Milz 20 Myel. 4	1000	100	30	15	1	60	60
F28 1	Milz 8,8 Myel. 2,2	1500	100	30	20	3	70	30
F29 1	Milz 8,8 Myel. 2,2	1000	100	30	15	3	60	60

Tab. 5 B Behandlung während und nach der Fusion

No.	Fusions- temp. °C	Inkubation nach Fusion	Einsaat- medium	Zelleinsaat in	Makrophagen- zugabe	Sonstiges
F22	37	keine	Dulbecco- HAT	je 1 Vert. 24-Lochpl.	zwei Tage vorher	Erythrozyten nicht lys.
F23	37	keine	Dulbecco- HAT	je 1 Vert. 24-Lochpl.	zwei Tage vorher	Erythrozyten nicht lys.
F24	37	keine	Dulbecco- HAT	je 1 Vert. 24-Lochpl.	zwei Tage vorher	Erythrozyten nicht lys.
F25	37	keine	Dulbecco- HAT	je 1 Vert. 24-Lochpl.	zwei Tage vorher	Erythrozyten nicht lys.
F26	37	keine	Dulbecco- HAT	je 1 Vert. 24-Lochpl.	zwei Tage vorher	Erythrozyten nicht lys.
F27	37	keine	Dulbecco- HAT	je 1 Vert. 24-Lochpl.	zwei Tage vorher	Erythrozyten nicht lys.
F28	37	10'FM 24°C 30'NM 37°C	Dulbecco- HAT	1 Vertief. 24-Lochpl.	gleich- zeitig	/
F29	37	10'FM 24°C 30'FM 24°C	Dulbecco- HAT	1 Vertief. 96-Lochpl.	gleich- zeitig	/

Tab. 6 A

Fusionen Verwendete Zellzahl und Einstellung des Gerätes

No.	n	Zellzahl x10 ⁶ /ml	Ausr. frequ. kHz	Duty cycle %	Ausr. zeit s	Impuls- dauer μs	Anzahl d. Imp.	Fusions- spannung V	Pre-Set s
F30	1	Milz 8,8 Myel.2,2	1000	100	30	15	3	60	60
F31	1	Milz 8,8 Myel.2,2	1000	100	30	15	3	60	60
F32	1	Milz 8,8 Myel.2,2	1000	100	30	15	3	60	60
F33	2	Milz 8,8 Myel.2,2	1000	100	30	15	3	60	60

Summe der Fusionen mit der Helikalkammer: 11

Summe der Fusionen mit der flachen Kammer: 72

Summe der Fusionen insgesamt: 83

Tab. 6 B Behandlung während und nach der Fusion

No.	Fusions- temp. °C	Inkubation nach Fusion	Einsaats- medium	Zelleinsaat in	Makrophagen- zugabe	Sonstiges
F30	37	10' FM, 30' NM feuchte Kam- mer 37°C	Dulbecco- HAT	1 Vertief. 96-Lochpl.	gleich- zeitig	/
F31	6	10' FM, 30' NM feuchte Kam- mer 37°C	Dulbecco- HAT	1 Vertief. 96-Lochpl.	gleich- zeitig	/
F32	6	10' FM, 30' NM feuchte Kam- mer 37°C	Dulbecco- HAT	1 Vertief. 96-Lochpl.	gleich- zeitig	/
F33	6	10' FM, 30' NM feuchte Kam- mer 37°C	Dulbecco- HAT	je 1 Vert. 96-Lochpl.	gleich- zeitig	/

1
5
8
1

FM: Fusionsmedium BUW-8401

NM: Nachfusionsmedium BUW-8402

4. Diskussion

Bei den Zellfusionen mittels Polyäthylenglykol fand in 85% (Fusion No. 1, 2 und 3) der mit Zellen beschickten Vertiefungen der Zellkulturplatten ein Koloniewachstum statt. Dieses Ergebnis entspricht dem Durchschnitt der schon vorher im Labor durchgeführten Zellfusionen mittels PEG. Die niedrige Kolonieausbeute bei der Fusion No. 4 kann als eine Ausnahme gewertet werden.

Bei den Elektrofusionen hingegen kam es bei nur einer einzigen von 83 durchgeführten Fusionen zum Heranwachsen von Kolonien (3 Stück), die zehn Tage überlebt haben.

Auf der Suche nach Erklärungen der schlechten Ausbeute bei den Elektrofusionen wurde zunächst die Vermutung geäußert, daß die Myelomzellen latent mit Mykoplasmen infiziert sein könnten. Dieser Verdacht wurde durch eine Untersuchung bestätigt, die von Frau Dr. Kahlau, Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern, Oberschleißheim, freundlicherweise durchgeführt worden war. Es wurde ein geringgradiger Befall der Myelomzellen mit Mykoplasmen diagnostiziert. Die relativ geringe Infektionsrate spielte bei Fusionen mittels PEG offensichtlich keine Rolle. Für die Elektrofusionen von Zellen stellt jedoch, nach Aussage von Prof. Dr. Zimmermann, die geringste Kontamination der Myelomzellen mit Mykoplasmen ein absolutes Hindernis dar, weil sich die Mykoplasmen zwischen die zu fusionierenden Zellen drängen und so die Fusion der

Zellmembranen verhindern. Nach dieser Feststellung wurden für die weiteren Fusionen mykoplasmenfreie Myelomzellen verwendet. Der erhoffte Erfolg blieb aber trotzdem aus.

Für Zellen einiger gewonnener Kolonien wurde vermutet, daß es sich um Fusionsprodukte von T-Lymphozyten und Myelomzellen handelte. Diese Annahme bestätigte Prof. Dr. Zimmermann (persönliche Rücksprache). Der erfahrene Autor wies ferner darauf hin, daß in seinem Labor vor den Elektrofusionen B-Lymphozyten von T-Lymphozyten getrennt werden. Dieser Hinweis wurde erhalten nachdem bei keiner der 83 durchgeführten Elektrofusionen die Trennung der Lymphozyten angewandt worden war. Die schlechte Ausbeute bei den eigenen Elektrofusionen dürfte somit in unserer Verwendung eines Lymphozytengemisches begründet sein. Anhand einiger Überlegungen kann dies verdeutlicht werden. Die Milz einer Maus hat normalerweise einen Anteil von bis zu 50% T-Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl (Belák et al., 1983). Das bedeutet, daß nach Aufbereitung der Milz nur etwa die Hälfte der erhaltenen Lymphozyten B-Zellen sind. Hinzu kommt die sehr geringe Anzahl von Zellen, die für die Elektrofusionen verwendet werden. Es wurden $8,8 \times 10^6$ Milzzellen pro ml Zellsuspension eingestellt, d.h. für die Helikalkammer (200 μ l) standen $1,76 \times 10^6$ und für die flache Kammer (14 μ l) nur $1,2 \times 10^5$ Milzzellen für die Fusion zur Verfügung. Bei den Fusionen mittels PEG wurden dagegen $1,2 \times 10^8$ Milzzellen verwendet, was etwa der 70-fachen bzw. 1000-fachen Menge entspricht.

Man sieht, daß bei den Elektrofusionen, so wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, die Chance, daß ein B-Lymphozyt für die Fusion auf eine Myelomzelle trifft, ziemlich gering ist.

Es scheint also unbedingt notwendig zu sein, vor den Elektrofusionen die B- und T-Lymphozyten voneinander zu trennen. Dazu gibt es verschiedene Möglichkeiten, nämlich mit Hilfe von zytotoxischen Antikörpern gegen T-Lymphozyten und Komplettierung (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Zimmermann) oder durch Lymphocyte-Panning (Koeppel, 1986). Eine gezielte Selektion von antikörperproduzierenden B-Lymphozyten beschrieb Lo et al. (1984). Er hat dazu kovalent an Avidin konjugiertes Antigen in Kontakt mit B-Lymphozyten gebracht. Das Antigen hat sich an die Oberflächenimmunglobuline der B-Zellen angeheftet, die spezifische, gegen das Antigen gerichtete Antikörper produzierten. Diesen B-Zell-Antigen-Avidin Komplex verbrachte er zu Myelomzellen, die Biotin an ihrer Oberfläche kovalent gebunden hatten. Avidin und Biotin gingen eine Bindung ein und stellten so den engen Kontakt zwischen B-Lymphozyten und Myelomzellen her, der zur Fusion der Zellen notwendig ist.

Vergleicht man die durchgeführten Fusionen mittels Polyäthylenglykol mit den Elektrofusionen, so muß man feststellen, daß die Erstgenannten von der Kolonieausbeute her weit überlegen sind. Es bleibt natürlich noch zu untersuchen, wie die Kolonieausbeute bei den Elektrofusionen sein wird, wenn man vor der Fusion die B- und T-Lymphozyten trennt. Auch vom Arbeits-, Zeit- und Geräteaufwand her

gesehen stellt sich die Fusion mittels PEG günstiger dar. Vor der Elektrofusion müssen die Erythrozyten lysiert werden, was ein zusätzlicher Arbeitsschritt bedeutet und bei der Fusion mittels PEG nicht erforderlich ist. Auch müssen bei der Fusion mittels PEG die B- und T-Lymphozyten nicht vorher getrennt werden.

Für die Elektrofusionen ist ein hoher Geräteaufwand erforderlich. Man braucht ein geeignetes Elektrofusionsgerät mit dazugehörigen Zellfusionskammern. Will man eine hohe Ausbeute an antikörperproduzierenden Hybridomzellen erreichen, so empfiehlt es sich die Helikalkammer zu verwenden (größeres Fassungsvermögen). Damit fällt aber ein Vorteil der Elektrofusion, nämlich die visuelle Kontrolle unter dem Mikroskop, weg.

Der Fusionsschritt selbst ist jedoch bei der Elektrofusion einfacher auszulösen als bei der Fusion mittels Polyäthylenglykol. Bei der Elektrofusion sind lediglich am Fusionsgerät die Parameter einzustellen und dann die Impulse auszulösen, während man bei der Fusion mittels PEG exakt nach der Stoppuhr mit genau abgemessenem Fusionsvermittler und Medien arbeiten muß, was natürlich ein Unsicherheitsfaktor bei der Fusion darstellt.

Zusammenfassend läßt sich bemerken, daß zur Gewinnung einer hohen Ausbeute an antikörperproduzierenden Hybridomzellen unter den beschriebenen Versuchsbedingungen die Fusion mittels PEG derzeit die Methode der Wahl darstellt. Bei der Elektrofusion muß man noch überprüfen, wie sich die

vorherige Trennung der B- und T-Lymphozyten auf die Kolonieausbeute auswirkt.

Die Elektrofusion von B-Lymphozyten und Myelomzellen hat sicherlich große Bedeutung für die Zukunft, nämlich durch die gezielte Fusion von einzelnen, vorher im rotierenden elektrischen Feld selektierten, antikörperproduzierenden B-Lymphozyten mit Myelomzellen (vgl. Schrifttum S. 29f).

5. Zusammenfassung

B-Lymphozyten von immunisierten BALB/c Mäusen wurden mit Mäusemyelomzellen (X 63 Ag8.653) zur Gewinnung antikörperproduzierender Hybridomzellen fusioniert. Dazu wurde die neue Technik der Elektrofusion verwendet und der herkömmlichen Technik mittels Polyäthylenglykol (4000) gegenübergestellt. Insgesamt wurden 83 Elektrofusionen durchgeführt. Lediglich im Anschluß an 8 Fusionen konnte ein Koloniewachstum festgestellt werden. Eine Fusion davon wurde bakteriell kontaminiert, die restlichen erhaltenen Kolonien starben ab, bevor sie einem Test auf Antikörperproduktion unterzogen werden konnten. Zellen aus einigen Kolonien wichen im Aussehen stark von "echten" Hybridomzellen (B-Lymphozyten x Myelomzellen) ab. Vermutlich handelte es sich bei diesen Zellen um Fusionsprodukte von T-Lymphozyten und Myelomzellen.

Fusionen mittels PEG wurden insgesamt viermal durchgeführt. Bei drei Fusionen fand in durchschnittlich 85% der mit Zellen beschickten Vertiefungen der Zellkulturplatten Koloniewachstum statt. Die Überstände wurden verschiedenen Tests auf Antikörperbildung unterzogen, wobei die Hamagglutinationshemmungsreaktion (HAH) und der Neutralisationstest (NT) negative Ergebnisse lieferten, während durchschnittlich 5,3% der Kulturüberstände im Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) positiv reagierten. Für diese Fusionen waren MVA-immunisierte Mäuse verwendet worden. Eine Fusion

wurde mit Milzzellen einer BCV V 270/83-immunisierten Maus durchgeführt. Bei dieser Fusion kam es in nur 6,8% der Vertiefungen zum Koloniewachstum. Auch hier lieferten die HAH und der NT negative Ergebnisse, während der ELISA in 42,3% der Kolonieüberstände antikörperpositiv ausfiel.

Summary

Attempts for gaining antibody-producing Hybridoma culture cells by means of Electrofusion in comparison with PEG-fusion.

B-Lymphocytes of immunized BALB/c Mice were fused with Mouse-Myeloma cells in order to obtain antibody-producing Hybridoma cells. A new technique "Electrofusion" was applied and compared to the conventional method using PEG (4000). A total of 83 Electrofusions were performed. Only at 8 fusions colony-growth could be observed. One of this fusions was bacterially contaminated, the others failed before they could be tested for antibody production. Cells from some colonies showed considerable morphological differences to the "real" Hybridoma cells (B-Lymphocytes x Myeloma cells). Probably they were fusion products from T-Lymphocytes and Myeloma cells.

Fusions using PEG were performed four times. Three fusions thereof showed cell-colony-growth in an average of 85% of the depressions in the culture-plate. The supernatants were submitted to various tests for antibody production. While the hemagglutinationinhibition test (HAH) as well as the neutralisation test (NT) were negative an average of 5,3% of the supernatants showed positive results in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). For these fusions MVA-immunized mice were used. One fusion was done on spleen-cells from a BCV V 270/83-immunized mouse. After this fusion,

colony-growth was observed in only 6,8% of the growth-plate depressions. Here too, the HAH and NT showed negative results, while the ELISA showed antibody production in 42,3% of the colony-supernatants.

b. Literaturverzeichnis

Ahkong, Q.F., Cramp, F.C., Fisher, D., Howell,
J.I., Lucy, J.A., 1972:
Studies on chemically induced cell fusion.
J. Cell Sci. 10, 769-787

Ahkong, Q.F., Fisher, D., Tampion, W., Lucy, J.A.,
1973:
The fusion of erythrocytes by fatty acids,
retinol and α -tocopherol.
Biochem. J. 136, 147-155

Ahkong, Q.F., Fisher, D., Tampion, W., Lucy, J.A.,
1975:
Mechanisms of cell fusion.
Nature 253, 194-195

Arnold, W.M., Zimmermann, U., 1982:
Rotation of an isolated cell in a rotating
electric field.
Naturwissenschaften 69, 297-298

Arnold, W.M., Zimmermann, U., 1984:
Electric field induced fusion and rotation of
cells.
In Chapman, D. (ed.): "Biological membranes",
Vol. 5, London: Academic Press, 1984,
389-454

Arnold, W.M., Zimmermann, U., 1986:

Cell fusion and measurement of membrane properties using electric fields and other forces.

Biochem. Soc. Transact. Vol. 14 No 2, 246-249

Belák, S., Tuboly, S., Varga, J., 1983:

Allatorvosi mikrobiológia.

Mezőgazdasági Kiadó, Budapest

Benz, R., Zimmermann, U., 1980:

Pulse length dependence of the electrical breakdown in lipid bilayer membranes.

Biochim. Biophys. Acta 597, 637-642

Cramp, F.C., Lucy, J.A., 1974:

Glycerol monooleate as a fusogen for the formation of heterokaryons and interspecific hybrid cells.

Exp. Cell Res. 87, 107-110

Croce, C.M., Sawicki, W., Kritchevsky, D.,

Koprowski, H., 1971:

Induction of homokaryocyte, heterokaryocyte and hybrid formation by lysolecithin.

Exp. Cell Res. 67, 427-435

Czerny, C.-P., 1986:

Zellkulturadaptierung des Humanen Coronavirus OC-43 und dessen epizootiologische Bedeutung
Vet. Med. Diss. München

Davidson, R.L., Gerald, P.S., 1976:

Improved techniques for the induction of mammalian cell hybridization by polyethylene glykol.

Somat. Cell Genet. 2, 165-176

Davidson, R.L., O'Mally, K.A., Wheeler, T.B., 1976:

Polyethylene glycol-induced mammalian cell-hybridization: Effect of polyethylene glycol molecular weight and concentration.

Somat. Cell Genet. 2, 271-280

Fazekas de St. Groth, S., Scheidegger, D., 1980:

Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics.

J. Immunol. Meth. 35, 1-21

Finaz, C., Lefevre, A., Teissie, J., 1984:

Electrofusion, a new highly efficient technique for generating somatic cell hybrids.

Exp. Cell Res. 150, 477-482

GCA/Precision Scientific Group, 1983:

Instruction and protocol manual

Zimmermann Cell Fusion™ System

Geffer, M.L., Margulies, D.H., Scharff, M.D., 1977:

A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells.

Som. Cell Genet. 3, 231-236

Hubert, P. 1985:

Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern
gegen Rotaviren und ihre Anwendung in der Dia-
gnostik

Vet. Med. Diss. München

Jungermann, K., Möhler, H., 1980:

Biochemie

Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York
436-439

Köhler, G., Milstein, C., 1975:

Continuous cultures of fused cells secreting
antibody of predefined specificity.

Nature 256, 495-497

Koeppel, P., 1986:

Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern
gegen Differenzierungsantigene von Schweine-
lymphozyten.

Vet. Med. Diss. München

Kuta, A.E., Rhine, R.S., Heebner, G.M., 1985:

Electrofusion. A new tool for biotechnology.

Int. Biotech. Lab. 3, 27-32

Lo, M.S., Tsong, T.Y., Conrad, M.K., Strittmatter,
S.M., Hester, L.D., Snyder, S.H., 1984:

Monoclonal antibody production by receptor-
mediated electrically induced cell fusion

Nature 310, 792-794

Lu, Chengping, 1985:

Isolierung, Charakterisierung und Epizootiologie Boviner Coronaviren
Vet. Med. Diss. München

Lucy, J.A., 1970:

The fusion of biological membranes.
Nature 227, 815-817

Mayr, A., Bachmann, P.A., Bibrack, B., Wittmann, G., 1974:

Virologische Arbeitsmethoden. Bd. 1: Zellkulturen, Bebrütete Hühnereier, Versuchstiere
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

Mayr, A., Stickl, H., Müller, H.K., Danner, K., Singer, H., 1987:

Der Pockenimpfstamm MVA: Marker, genetische Struktur, Erfahrungen mit der parenteralen Schutzimpfung und Verhalten im abwehrgeschwächten Organismus
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abst. Orig. B 167, 375-390

Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P.H., 1982:

Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields.
EMBO J., 1, 841-845

Norwood, T.H., Zeigler, C.J., Martin, G.M., 1976:

Dimethyl sulfoxide enhances polyethylene glycol-mediated somatic cell fusion.
Somat. Cell Genet. 2, 263-270

Pontecorvo, G., 1975:

Production of mammalian somatic cell hybrids
by means of polyethylene glykol treatment.

Somat. Cell Genet. 1, 397-400

Richter, H.P., Scheurich, P., Zimmermann, U., 1981:

Elektric field induced fusion of sea urchin
eggs.

Dev. Growth Differ. 23, 479-486

Tappert, H., 1981:

Versuche zur Produktion von monoklonalen Anti-
körpern gegen Rotaviren.

Vet. Med. Diss., München

Toister, Z., Loyter, A., 1971:

Ca^{2+} -induced fusion of avian erythrocytes.

Biochim. Biophys. Acta 241, 719-724

Vienken, J., Zimmermann, U., 1982:

Electric field induced fusion: electro hydrau-
lic procedure for production of heterokaryon
cells in high yield.

FEBS Lett. 137, 11-13

Vienken, J., Zimmermann, U., Fouchard, M.,

Zagury, D., 1983:

Electrofusion of myeloma cells on the single
cell level.

FEBS Lett. 163, 54-56

Vienken, J., Zimmermann, U., 1985:

An improved electrofusion technique for production of mouse hybridoma cells.

FEBS Lett. Vol. 182 No 2, 278-280

Westerwoudt, R.J., 1985:

Improved fusion methods. IV technical aspects.

J. Immunol. Meth. 77, 181-196

Zimmermann, U., Schultz, J., Pilwat, G., 1973:

Transcellular ion flow in E. coli B and electrical sizing of bacterias.

Biophys. J. 13, 1005-1013

Zimmermann, U., Pilwat, G., Riemann, F., 1974:

Reversibler dielektrischer Durchbruch von Zellmembranen in elektrostatischen Feldern

Z. Naturforsch. 29c, 304-305

Zimmermann, U., Pilwat, G., 1978:

Sixth int. biophys. cong. Kyoto

Abstr. IV-19(H), 140

Zimmermann, U., Vienken, J., Scheurich, P., 1980a:

Electric field induced fusion of biological cells.

Biophysics of Structure and Mechanism, Vol. 6
Springer Internat. New York p.86

Zimmermann U., Vienken, J., Pilwat, G., 1980b:

Development of drug carrier systems: electrical field induced effects in cell membranes.

Bioelectrochem. Bioenerg. 7, 553-574

- Zimmermann, U., Scheurich, P., Pilwat, G.,
Benz, R., 1981:
Cells with manipulated functions: new perspectives for cell biology, medicine, and technology.
Angewandte Chemie 20, 325-344
- Zimmermann, U., 1982:
Electric field mediated fusion and related electrical phenomena.
Biochim. Biophys. Acta 694, 227-277
- Zimmermann, U., Vienken, J., 1982:
Electric field induced cell-to-cell fusion.
J. Membrane Biol. 67, 165-182
- Zimmermann, U., Pilwat, G., Pohl, H.A., 1982:
Electric field mediated cell fusion.
J. Biol. Phys. 10, 43-50
- Zimmermann, U., 1983:
Electrofusion of cells: principles and industrial potential.
Trends Biotechnol. 1, 149-155
- Zimmermann, U., Vienken, J., 1984:
Electric field mediated cell-to-cell fusion.
In Beers, R.F., Bassett, E.G. (ed.): "Cell fusion, gene transfer and transformation."
New York: Raven Press, pp. 171-187

Zimmermann, U., Vienken, J., Pilwat, G., Arnold, W.M., 1984:

Electrofusion of cells: principles and potentials for the future.

In Evered, D., Whelan, J. (eds): "Cell fusion," Ciba Foundation Symposium 103. London: Pitman books, pp. 60-85

Zimmermann, U., Vienken, J., Pilwat, G., 1984a:

Electrofusion of cells.

In Chayen, D., Bitensky, J. (eds): "Investigative microtechniques in medicine and biology." New York: Dekker Inc., pp. 89-167

Zimmermann, U., Vienken, J., Halfmann, J., Emeis, C.C., 1985:

Electrofusion: A novel hybridization technique. Advances in Biotech. Processes 4, 79-150

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr danke ich
herzlich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Besonders bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. H.
Mahnelt für die Überlassung des Themas und vor allem
für seine bereitwillige Unterstützung, seine Freund-
lichkeit und seine Hilfsbereitschaft.

Herr Dr. W. Eichhorn und Herr Dr. C.-P. Czerny stan-
den mir mit Rat und Tat zur Seite wofür ich mich
herzlich bedanke.

Der Isolierabteilung möchte ich für das freundliche
Arbeitsklima danken.

Ulrike danke ich für ständiges Interesse und
seelische Unterstützung.

Lebenslauf

- 1958 geboren am 23. September als 3. Kind des Kfz-Meisters Norbert Brengel und seiner Ehefrau Margareta, geborene Fess
- 1965 Eintritt in die Volksschule in Homburg (Saar)
- 1968 Übertritt in das Staatliche Männlich-Gymnasium in Homburg
- 1979 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
Beginn der Ausbildung als Tierarzhelferin in München
- 1980 Aufnahme des Studiums der Veterinärmedizin in München
- 1981 im Oktober Hochzeit mit Andras Gal
- 1985 im November Staatsexamen
- 1986 im Januar Beginn der vorliegenden Dissertation und Approbation als Tierärztin
im September Geburt meines Sohnes

